

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願

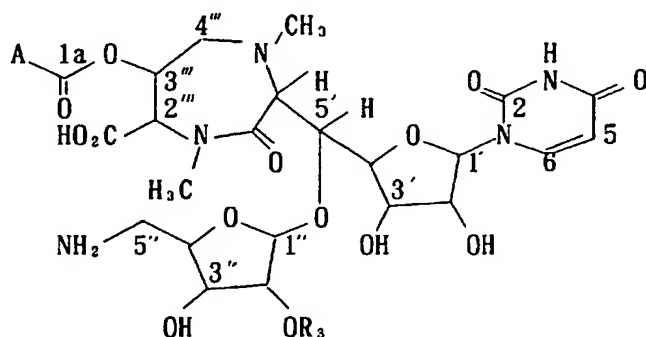
| | | |
|--|---|--|
| (51) 国際特許分類 C12P 17/16, C12N 1/20, C07H 19/06, A61K 31/70 // (C12P 17/16, C12R 1:465) (C12N 1/20, C12R 1:465) | A1 | (11) 国際公開番号 WO97/41248 (43) 国際公開日 1997年11月6日(06.11.97) |
| (21) 国際出願番号 PCT/JP97/01466 (22) 国際出願日 1997年4月25日(25.04.97) (30) 優先権データ 特願平8/131444 1996年4月26日(26.04.96) (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 雪印乳業株式会社 (SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO., LTD.)[JP/JP] 〒065 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号 Hokkaido, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 木村賢一(KIMURA, Ken-ichi)[JP/JP] 〒321 栃木県宇都宮市平松町878-9 Tochigi, (JP) 池田善和(IKEDA, Yoshikazu)[JP/JP] 〒329-05 栃木県下都賀郡石橋町大松山1-1-3 SKマンション2-B Tochigi, (JP) 各務 忍(KAGAMI, Shinobu)[JP/JP] 〒329-05 栃木県下都賀郡石橋町石橋58-2 松原マンション2A Tochigi, (JP) 高橋英俊(TAKAHASHI, Hidetoshi)[JP/JP] 〒329-04 栃木県河内郡南河内町緑3-14-8 Tochigi, (JP) | (73) 権利者 高橋公咲(TAKAHASHI, Kousaku)[JP/JP] 〒321-01 栃木県宇都宮市兵庫塚1-9-26 グランドヒル幹G-202 Tochigi, (JP) 吉浜 誠(YOSHIIHAMA, Makoto)[JP/JP] 〒321-01 栃木県宇都宮市江曾島町1400-8 Tochigi, (JP) 生方 信(UBUKATA, Makoto)[JP/JP] 〒939-03 富山県射水郡小杉町太閤山9-3-1 Toyama, (JP) 磯野 清(ISONO, Kiyoshi)[JP/JP] 〒330 埼玉県大宮市大和田町1丁目291-14 Saitama, (JP) (74) 代理人 弁理士 藤野清也(FUJINO, Seiya) 〒160 東京都新宿区四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AU, CA, JP, NZ, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書 | |
| (54) Title: NOVEL ANTIBIOTICS RK-1061 AND PROCESS FOR PREPARING THE SAME (54) 発明の名称 新規抗生物質 RK-1061 類及びその製造方法 <div data-bbox="386 1213 1339 1617"></div> (57) Abstract Antibiotics RK-1061 having a novel chemical structure and a process for preparing the same. They have a structural formula represented by general formula (I) wherein A represents R ₁ or R ₂ , CH(OR ₂)CH ₂ , R ₂ represents a 3-methylglutaric acid residue and R ₃ represents a sulfate group or a hydrogen atom. The process comprises culturing a ray fungus belonging to the genus Streptomyces and isolating RK-1061 from the culture. Streptomyces sp.SN-1061M (FERM BP-5800) is capable of stably producing RK-1061 at a high productivity. | | |

(57) 要約

新規な化学構造を有する抗生物質 RK-1061類及びその製造法。

式(I) で示される構造式をもつ抗生物質 RK-1061類、式中 A は、 R_1 又は $R_1CH(O$
 $R_2)CH_2$ を示す。 R_2 は 3-メチルグルタル酸残基を、 R_3 は、硫酸基または水素原子
を示す。

ストレプトミセス属に属する放線菌を培養し、培養物中から RK-1061 類を単離
する方法。 RK-1061 類を安定的にかつ高生産するストレプトミセス sp. SN-1061M
株 (FERM BP-5800)。



(I)

参考情報

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL アルバニア
AM アルメニア
AT オーストリア
AU オーストラリア
AZ アゼルバイジャン
BA ボスニア・エルツェゴビナ
BB パルバドス
BE ベルギー
BF ブルキナ・ファソ
BG ブルガリア
BJ ベナン
BR ブラジル
BY ベラルーシ
CA カナダ
CF 中央アフリカ共和国
CG コンゴ
CH スイス
CI コート・ジボアール
CM カメルーン
CN 中国
CU キューバ
CZ チェッコ共和国
DE ドイツ
DK デンマーク
EE エストニア

ES スペイン
FI フィンランド
FR フランス
GB ガボン
GE ジョージア
GH ガーナ
GM ガンビア
GN ギニア
GR ギリシャ
HU ハンガリー
ID インドネシア
IE アイルランド
IL イスラエル
IS アイスランド
IT イタリア
JP 日本
KE ケニア
KG キルギスタン
KP 朝鮮民主主義人民共和国
KR 大韓民国
KZ カザフスタン
LC セントルシア
LI リヒテンシュタイン
LK スリランカ

LR リベリア
LS レソト
LT リトアニア
LU ルクセンブルグ
LV ラトヴィア
MC モナコ
MD モルドヴァ共和国
MG マダガスカル
MK マケドニア共和国
ML マリ
MN モンゴル
MR モリタニア
MW マラウイ
MX メキシコ
NE ニジェール
NL オランダ
NO ノルウェー
NZ ニュージーランド
PL ポーランド
PT ポルトガル
RO ルーマニア
RU ロシア連邦
SD スーダン
SE スウェーデン

SG シンガポール
SI スロヴェニア
SK スロヴァキア共和国
SL シエラレオネ
SN セネガル
SZ スワジランド
TD チャド
TG トーゴ
TJ タジキスタン
TM トルクメニスタン
TR トルコ
TT トリニダード・トバゴ
UG ウガンダ
UA ウクライナ
US 米国
UZ ウズベキスタン
VN ヴイエトナム
YU ユーゴスラビア
ZW ジンバブエ

明 細 書

新規抗生物質RK-1061 類及びその製造方法

技術分野

本発明は、リポシドマイシン類と命名された新規抗生物質RK-1061 類、その薬理的に許容される塩ならびにその製造方法に関する。

従来技術

特異性が高く、且つ副作用の少ない抗菌剤を開発する場合、原核生物である細菌に特異的に存在するが、真核生物である人には存在しない部位をターゲットとする薬剤が望まれる。その様な特異的な部位の一つに、細菌の細胞壁成分のペプチドグリカンがあり、例えばペプチドグリカンに作用する現在実用化されている医薬品にはペニシリン系、セフェム系、カルバペネム系、モノバクタム系、サイクロセリン、バシトラシン、バンコマイシン、ホスホマイシン等が知られている。

発明の開示

抗生物質の場合、いくら優れた薬剤でも長期間の使用により耐性菌が生じることは周知の事実であり、また薬剤によっては、神経障害、腎障害、肝障害などの副作用を有している。また、最近ではMRSA（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌）の院内感染や胃潰瘍、胃癌の原因にも一役買っていると言われているヘリコバクター・ピロリ（*Helicobacter pylori*）の問題などが新たに生じてきている。係る観点から常に新しい構造及び作用機作の抗生物質の開発が求められている。抗生物質リポシドマイシン(liposidomycin) (RK-1061) 類は、ペプチドグリカン合成を阻害するスクリーニング系により見いだされた。作用点は、ペプチドグリカ

ン合成のリピドサイクルの最初の酵素ホスホ-N-アセチルムラミル-ペンタペプチド トランスフェラーゼ (Phospho-N-acetylmuramyl-pentapeptide transferase (EC 2.7.8.13), Phospho-MurNAc-pentapeptide translocase, UDP-MurNAc-pentapeptide phosphotransferase, 通称トランスロケース I) を特異的に阻害し (Agric. Biol. Chem., 53(7), 1811~1815 (1989))、かつ構造的にも硫酸基とユニークなアミノ糖を有する Fatty acyl nucleoside系抗生物質である点が特徴的である。同様の作用点を有する既知物質にツニカマイシン (Tunicamycin, 「Tunicamycin」, Japan Scientific Societies Press, 1982, Tokyo) やムレイドマイシン (Mureidomycin, J. Antibiot., 42, 662~679, (1989)、Antimicrob. Agents Chemother., 35, 234~236 (1991)) が知られているが、文献上ではそれらとは抗菌スペクトルが異なり、かつペプチドグリカン合成においてもリポシドマイシンは強力な阻害活性を有している。したがって、透過性や安定性の問題が無ければ、理論的にはペプチドグリカンに有する全ての細菌に有効となる可能性を有している。

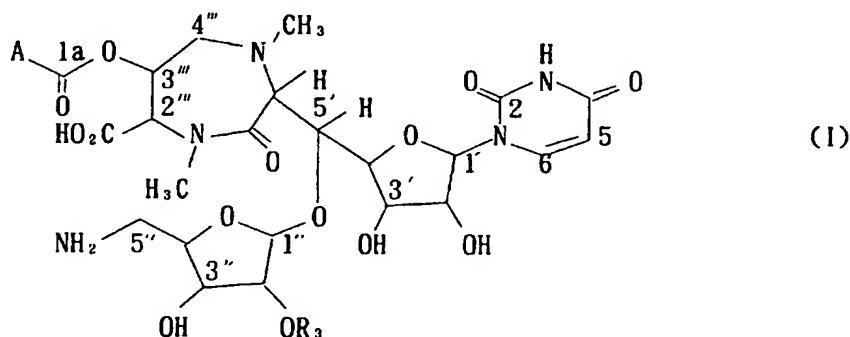
特にリポシドマイシンは、抗酸菌である Mycobacterium 属に非常に強い抗菌活性を示し (J. Antibiot., 38, 1617 ~1621 (1985))、現在有効な薬剤が無いリファンピシンなどの既存の抗結核薬に耐性となった Mycobacterium tuberculosis に有効性が期待される。また、エイズ患者の爆発的な増大に伴うカリニ肺炎などの日和見感染症が重要な問題であり、その原因となる不定型の抗酸菌 Mycobacterium avium complex (MAC) にも有効性が期待される。

本発明者らは、多成分から成る抗生物質 RK-1061 類の収量を高め、新規成分を単離すべく製造法の検討を行ってきたところ、これまでに報告された RK-1061A (リポシドマイシン A)、RK-1061B (リポシドマイシン B)、RK-1061C (リポシドマイシン C) (特開昭 61-282088 号)、RK-1061G (リポシドマイシン G)、RK-1061H (リポシドマイシン H) (特開平 2-306992 号) とは異なる物質を得た。即

ち、これまでの物質は全て後述の構造式(II)に分類できるタイプの物質であったが、本発明で得られたリポシドマイシン類は構造式(II)タイプの R_1 置換基が新規である化合物ばかりではなく、構造式(III)、(IV)及び(V)に属する3つの異なったタイプに分類できる新規物質であった。さらに、本発明で得られた新規抗生物質リポシドマイシン類(RK-1061類)、特に硫酸基のはずれた構造式(IV)、(V)では、これまでの化合物に比べ著しい抗菌活性の上昇が認められ、本発明を完成するに至った。

本発明の目的は、新規抗生物質リポシドマイシン類(RK-1061類)、その高生産株、及びその製造方法を提供することにある。

本発明は次の一般式(I)で示されるリポシドマイシン類(RK-1061類)またはその薬理的に許容される塩に関する。



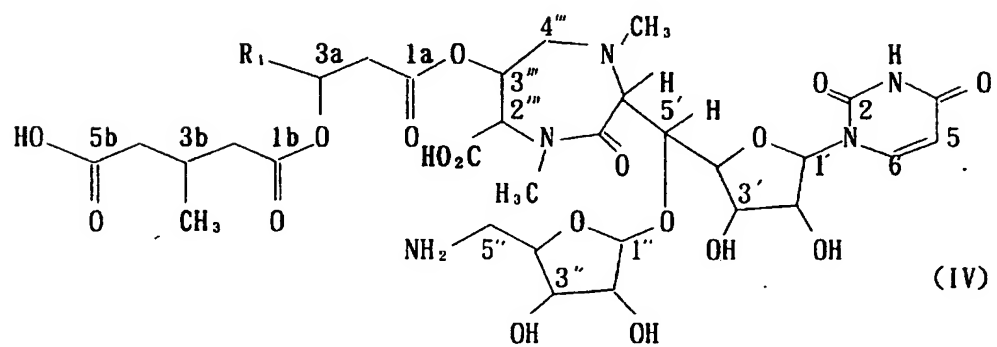
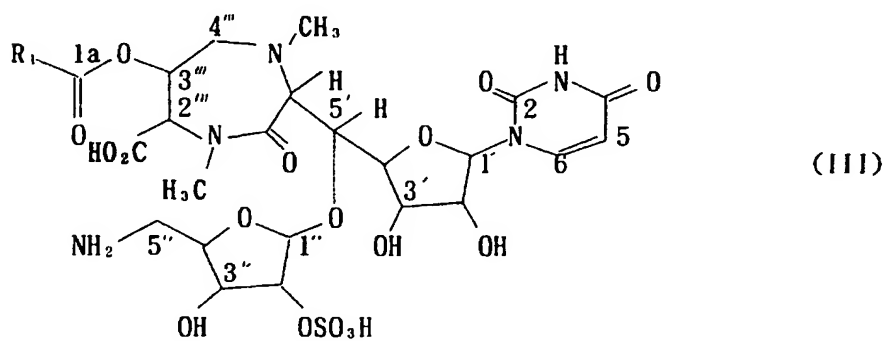
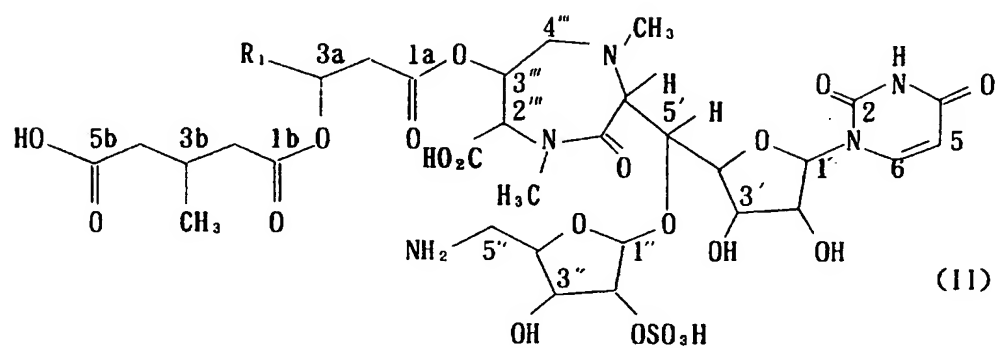
式中、A は R_1 又は $R_1CH(OR_2)CH_2$ を示す。

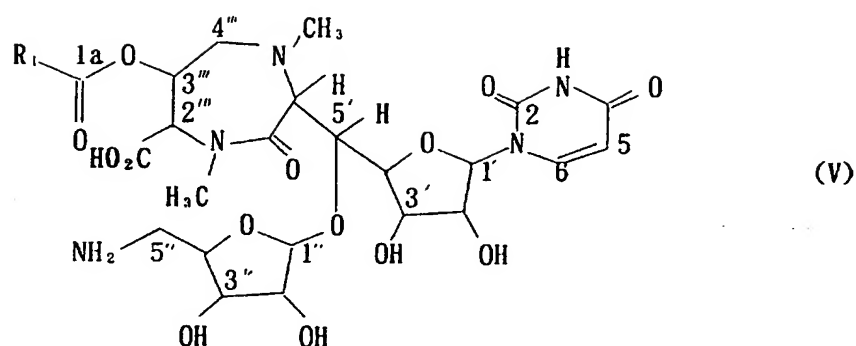
R_2 は3-メチルグルタル酸残基($-CO-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-COOH$)を示し、 R_3 は水素原子(H) または硫酸基(SO_3H)を示す。

また、 $R_1CH(OR_2)CH_2$ のとき、 R_1 は C_nH_{2n+1} (n は 1 ~ 20 の整数を示す)、 C_nH_{2n-1} (n は 2 ~ 21 の整数を示す) または C_nH_{2n-3} (n は 3 ~ 22 の整数を示す) である。

また、 R_1 のとき、 R_1 は C_nH_{2n-1} (n は 2 ~ 21 の整数を示す)、 C_nH_{2n-3} (n は 3 ~ 22 の整数を示す)、または C_nH_{2n-5} (n は 4 ~ 23 の整数を示す) である。

これらの具体的な化合物には次式(II)～(V)で表されるリポシドマイシン類を挙げることができる。





式中、 R_1 は前記と同じ意味をもつ。

上記一般式(I)の置換基A及び R_3 の種類に応じて本発明のリポシドマイシンRK-1061類を次のようなタイプに分けられる。すなわち、Aが $R_1CH(OR_2)CH_2$ であるタイプ（ここでは、 R_2 が3-メチルグルタル酸残基である）と R_1 （ここでは、 R_2 が存在しない、このように R_1 とCOとが直接結合するものを R_2 直接結合という）とに分けられ、さらに R_3 が硫酸基であるものと、水素原子であるものによってそれぞれ分類される。

| | 置 換 基 | | 構造式 |
|--------|--------------|-------|------|
| | R_2 | R_3 | |
| タイプI | 3-メチルグルタル酸残基 | 硫酸基 | 式II |
| タイプII | 直接結合 | 硫酸基 | 式III |
| タイプIII | 3-メチルグルタル酸残基 | 水素原子 | 式IV |
| タイプIV | 直接結合 | 水素原子 | 式V |

また、本発明におけるこれらのRK-1061類の薬理的に許容される塩には、塩酸塩、硫酸塩、ナトリウム又はカリウム等のアルカリ金属塩、マグネシウム又はカルシウム等のアリカリ土類金属塩、アルミニウムその他の金属塩、及びアルキルアミン塩、ピリジン塩等の有機アミン塩等が挙げられる。

さらに本発明は、上記式で示されるリポシドマイシンRK-1061 類の製造法に関する。

すなわち、本発明の製造法は、ストレプトミセス属に属し、前記リポシドマイシンRK-1061 類産生能を有する微生物を培地に培養し、該リポシドマイシンRK-1061 類を産生させ、その培養物から産生された該リポシドマイシンRK-1061 類を採取することよりなるリポシドマイシンRK-1061 類の製造法である。

本発明におけるこれらの化合物は、高速液体クロマトグラフィー等を行ってその保持時間の差を利用する等によりそれぞれの化合物を単離することができる。

さらに、本発明においては、培地の炭素源を特定することによって、リポシドマイシンRK-1061 類のR₃が硫酸基である化合物あるいはR₃が水素原子である化合物を選択的に産生せしめ、これらの化合物を製造することができる。

すなわち、炭素源としてグルコースまたはマルトースを用いるとR₃が硫酸基であるリポシドマイシンRK-1061 類を多く得ることができるし、また、キシロース、ラクトース、D-フラクトース、シュクロース、イノシトール及びD-マンニトールよりなる群から選択される少なくとも1種の炭素源を用い、また窒素源として、小麦胚芽またはマルトエキストラクトを用いることによって、R₃が水素原子であるリポシドマイシンRK-1061 類を多く得ることができる。

本発明におけるリポシドマイシンRK-1061 類産生能を有する放線菌としては、本発明者らによって山梨県御坂町の土壤中から見い出された土壤細菌のストレプトミセス・エスピー・RK-1061(*Streptomyces* sp. RK-1061、以下 RK-1061株という)を例示することができる。この菌株は、通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 微工研菌寄第8278号 (FERM P-8278)として寄託されている。このFERM P-8278 株を請求した特許出願は、すでに登録特許第1902732 号として1995年2月8日付で登録されているので、この菌株は、適正な手続をとれば何人も入手可能な状態にある。

また、RK-1061 株の生産性の低さとその不安定性を改善するために、U V 照射にて生産性を改善した人工変異株ストレプトミセス sp. SN-1061M (Streptomyces sp. SN-1061M、以下、SN-1061M株という)を例示することができる。この菌株は、通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM BP-5800 号として寄託されている。

図面の簡単な説明

第 1 図は、リポシドマイシン Z-(III) の赤外吸収スペクトル(KBr)を示す。

第 2 図は、リポシドマイシン Z の ¹H-NMR スペクトル(500MHz, CD₃OD)を示す。

×は、本発明の物質とは無関係なコンタミによるピークを示す。

第 3 図は、リポシドマイシン L の ¹H-NMR スペクトル(500MHz, CD₃OD)を示す。

×は、本発明の物質とは無関係なコンタミによるピークを示す。

第 4 図は、リポシドマイシン M の ¹H-NMR スペクトル(500MHz, CD₃OD)を示す。

第 5 図は、リポシドマイシン K の ¹H-NMR スペクトル(500MHz, CD₃OD)を示す。

第 6 図は、リポシドマイシン N の ¹H-NMR スペクトル(500MHz, CD₃OD)を示す。

第 7 図は、リポシドマイシン A-(II)の ¹H-NMR スペクトル(500MHz, CD₃OD)を示す。×は、本発明の物質とは無関係なコンタミによるピークを示す。

第 8 図は、リポシドマイシン X-(III)の ¹H-NMR スペクトル(500MHz, CD₃OD)を示す。×は、本発明の物質とは無関係なコンタミによるピークを示す。

第 9 図は、リポシドマイシン Y-(III)の ¹H-NMR スペクトル(500MHz, CD₃OD)を示す。×は、本発明の物質とは無関係なコンタミによるピークを示す。

第 10 図は、リポシドマイシン Z-(III)の ¹H-NMR スペクトル(500MHz, CD₃OD)を示す。

第 11 図は、リポシドマイシン C-(III)の ¹H-NMR スペクトル(500MHz, CD₃OD)を示す。×は、本発明の物質とは無関係なコンタミによるピークを示す。

第 12 図は、リポシドマイシン V-(III)の ¹H-NMR スペクトル(500MHz, CD₃OD)

を示す。×は、本発明の物質とは無関係なコンタミによるピークを示す。

第13図は、リポシドマイシンA-(III)の¹H-NMR スペクトル(500MHz, CD₃OD)を示す。

第14図は、リポシドマイシンG-(III)の¹H-NMR スペクトル(500MHz, CD₃OD)を示す。×は、本発明の物質とは無関係なコンタミによるピークを示す。

第15図は、リポシドマイシンM-(III)の¹H-NMR スペクトル(500MHz, CD₃OD)を示す。×は、本発明の物質とは無関係なコンタミによるピークを示す。

第16図は、リポシドマイシンK-(III)の¹H-NMR スペクトル(500MHz, CD₃OD)を示す。×は、本発明の物質とは無関係なコンタミによるピークを示す。

第17図は、リポシドマイシンN-(III)の¹H-NMR スペクトル(500MHz, CD₃OD)を示す。×は、本発明の物質とは無関係なコンタミによるピークを示す。

第18図は、リポシドマイシンA-(IV)の¹H-NMR スペクトル(500MHz, CD₃OD)を示す。×は、本発明の物質とは無関係なコンタミによるピークを示す。

第19図は、実施例2、実施例3及び実施例4で得られたリポシドマイシン類(RK-1061類)のTLCを示す。なお、培地の炭素源 A:マルトース、B:キシロース、C:ラクトース、D:D-フラクトース、E:シュクロース、F:イノシトール、G:L-ラムノース、H:L-アラビノース、I:D-マンニトール、J:ラフィノース、K:サリシン、L:L-ソルボース、M:D-グルコサミンを示す。

第20図は、実施例2で得られたリポシドマイシン類(RK-1061類)のHPLCを示す。

第21図は、実施例4で得られたリポシドマイシン類(RK-1061類)のHPLCを示す。

発明を実施するための最良の形態

〔発明で使用する微生物〕

まず、本発明において用いる微生物について説明する。本発明で用いられる微生物はストレプトミセス属に属し、リポシドマイシンRK-1061 類の産生能を有する放線菌である。その一例として、前記 RK-1061株がある。この微生物は、上記の特性を有し、本発明の抗生物質リポシドマイシン類を有利に生産することができ、本発明の方法に有効に利用しうるものである。

また、上記 RK-1061株の自然的及び人工的変異株は勿論、ストレプトミセス属に属する菌種で後述の抗生物質リポシドマイシン類の産生能を有する微生物は、すべて本発明方法において使用することができる。特に、RK-1061 株のリポシドマイシン類産生能をUV照射にて改善したSN-1061M株はより有効な微生物である。

前記 RK-1061類は、山梨県御坂町の土壌から土壌細菌の分離に使用される通常の方法で採取することができた。

この菌株の菌学的性質を示す。その菌学的性質は、特開昭 61-282088号公報及び特開平2-306992号公報にすでに記載されており、公知のものである。

1) 形態上の性質

RK-1061 株は山梨県御坂町で採取した土壌より分離した放線菌で、全細胞の塩酸加水分解のペーパークロマトグラフィーではL-リジンアミノピメリン酸だけを検出し、メソ-リジンアミノピメリン酸は検出されない。各種寒天培地上での生育試験では、試験した10種の全ての培地上に発育するが、スターチ・イーストエキス寒天培地上での発育は良好で気中菌糸と胞子の着生は豊富だが、これ以外の寒天培地上での気中菌糸と胞子の着生は良好でない。11種の糖を炭素源とする利用試験においては、RK-1061 株は全ての糖を利用し発育する。この本菌の気中菌糸は灰色系であり、裏面は淡褐色系であって特徴はない。脱脂牛乳中での発育では初めに凝固を起こすが後にペプトン化し茶色の透明液を与える。澱粉を加水分解するが、ゼラチンを液化しない。ペプトン・イーストエキス・鉄寒天培地およびチロシン寒天培地上でメラニン色素の生成が認められるが可溶性色素は淡褐色

ないし灰色で特徴ある色素の生成は認められない。電子顕微鏡の観察によると気中菌糸は直状柔性であり、オートミール・硝酸塩寒天培地およびポテトエキストラクト・イーストエキストラクト硝酸塩寒天培地上では3～5回のらせん状菌糸がみられ、前者培地では密ならせん状であるが後者ではオープンスパイラルである。一方イーストエキス、モルトエキス寒天培地上に発育したものではらせん菌糸は認め難い。この本菌の胞子は菌糸先端より多数連なって形成され、らせん菌糸部分は胞子化する。胞子表面は平滑であるがしわ状である。胞子の大きさは長さ0.5～1.0 マイクロメートル、幅0.5～0.7 マイクロメートルである。スポランギア及び運動性胞子は観察されなかった。

2) 各種培地上の生育状態 (27℃、3週間培養)

a) シュクロース・硝酸塩寒天培地

発育 : 普通
気菌糸 : なし
裏面 : 2 b a (パール)
可溶性色素 : なし

b) グルコース・アスパラギン寒天培地

発育 : 普通
気菌糸 : なし
裏面 : 2 b a (パール)
可溶性色素 : なし

c) グリセロール・アスパラギン寒天培地

発育 : 普通
気菌糸 : なし
裏面 : 2 b a (パール)
可溶性色素 : なし

d) スターチ・無機塩寒天培地

発育 : 良好
気菌糸 : なし
裏面 : 2 b a (パール)
可溶性色素 : なし

e) チロシン寒天培地

発育 : 普通
気菌糸 : 少量 b + 3 n i + 4 n i (オイスターホワイト+コバートブラウン+チェストナットブラウン)
裏面 : 3 p n (ダークブラウン)
可溶性色素 : 3 p l (ディープブラウン)

f) 栄養寒天培地

発育 : 不良
気菌糸 : なし
裏面 : 3 n g (イエローメイプル)
可溶性色素 : 3 n g (イエローメイプル)

g) イーストエキス・モルトエキス寒天培地

発育 : 普通
気菌糸 : 豊富 e (グレー)
裏面 : 3 p i (ゴールドブラウン)
可溶性色素 : 3 p n (ダークブラウン)

h) オートミール寒天培地

発育 : 普通
気菌糸 : 普通 5 g e (ローズウッド)
裏面 : 4 g e (ローズベージュ)

可溶性色素：なし

i) ペプトン・イーストエキス・鉄寒天培地

発育：不良

気菌糸：なし

裏面：2 b a (パール)

可溶性色素：5 p n (ダークブラウン)

j) スターチ・イーストエキス寒天培地

発育：良好

気菌糸：豊富 4 g e + 4 l i (ローズベージュ+ビーバー)

裏面：4 g e (ローズベージュ)

可溶性色素：1 i h (オリーブグレー)

なお、色記号の記載はディスクリプティブ・カラー・ネームズ・ディクショナリー (Descriptive color names dictionary) 第4版の色名記号に従った。

3) 各種炭素源の資化性 (プリドハム・ゴッドリーブ寒天培地、27℃培養)

| | 発育状況 |
|----------|------|
| L-アラビノース | ++ |
| D-キシロース | +++ |
| D-グルコース | ++ |
| D-フルクトース | + |
| シュクロース | + |
| イノシトール | + |
| L-ラムノース | + |
| ラフィノース | + |
| D-マンニトール | + |
| ラクトース | +++ |
| メリビオース | ++ |

＋：発育する

++：良く発育する

+++：非常に良く発育する

4) その他の生理的諸性質 (27℃培養)

1. ゼラチンの液化 (グルコース・ペプトン・ゼラチン培地)

液化しない。

2. スターチの加水分解 (スターチ・無機塩寒天培地)

加水分解する。

3. 脱脂牛乳の凝固とペプトン化

凝固しペプトン化する。

4. メラニン様色素の形成

チロシン寒天培地、ペプトン・イーストエキス・鉄寒天培地上での色素の生成がある。

5. 生育温度: 20℃～35℃

上記の諸性質を有するストレプトミセス属、すなわち、灰色系でスパイラル菌糸を有し、メラノイド様色素を生成し、孢子平面が平滑であり、前記の糖を利用する種をバージェイズ・マニュアル・オブ・ディタミネイティブ・バクテリオロジー第8版 (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th edition (1974)) により調べた。その結果、本菌は、ストレプトミセス・グリゼオスポレウス (Streptomyces griseosporus) か、これに極めて近縁の種と推定される。

本発明の抗生物質 RK-1061類 (請求項1～5のいずれかに記載の抗生物質)、あるいはその塩を大量に生産することのできる菌ストレプトミセス sp. SN-1061M (Streptomyces sp. SN-1061M) (FERM BP-5800) を得るための変異法の一例を以下に示す。

本発明の抗生物質 RK-1061類あるいはその塩の生産菌ストレプトミセス sp. RK-1061 (Streptomyces sp. RK-1061) (FERM P-8278) の生育したスターチ・イースト寒天培地スラントから、10mlの生理食塩水で孢子をかきとり、 1×10^8 細胞/ml になるようにシャーレに播種した。これに細胞の約1%が生育するような条件に

てUVを照射し変異をおこさせ、生育したコロニーを同様の培地のスラントに接種した。66株をK1培地(シュクロース(和光純薬社)40g、大豆粉(豊年製油社)30g、小麦胚芽(シグマ社)またはマルトエキストラクト(ディフコ社)20g、塩化ナトリウム(和光純薬社)6gの組成でpHを7.0に調整した培地)で培養し、その中でMycobacterium phleiに対し抗菌活性の高かった1株を選択し、ストレプトミセス sp. SN-1061M (Streptomyces sp. SN-1061M)(FERM BP-5800)とした。以下にこの菌株の性質を示す。

1) 形態上の性質

ストレプトミセス sp. SN-1061Mの各種寒天培地上での生育試験では、試験した8種の全ての培地上に発育する。10種の糖を炭素源とする利用試験においては、L-ラムノースの利用が悪い点以外は、本菌は全ての糖を利用し発育する。本菌の気中菌糸は白色系であり、裏面は淡褐色系であって特徴はない。脱脂牛乳中での発育では凝固を起こさず、後にペプトン化し茶色の透明液を与える。澱粉の加水分解と、ゼラチンの液化は起こさない。イースト・麦芽寒天培地(ISP No. 2)、ペプトン・イースト・鉄寒天培地(ISP No. 6)、およびチロシン寒天培地(ISP No. 7)上でメラニン色素の生成が認められるが可溶性色素は淡褐色ないし褐色で特徴ある色素の生成は認められない。電子顕微鏡の観察によると気中菌糸は直状柔性であり、スターチ・イースト寒天培地上では6~10回の密ならせん状菌糸がみられる。本菌の胞子は、菌糸先端より多数連なって形成され、らせん菌糸部分は胞子化する。胞子表面は平滑であるが、しわ状である。胞子の大きさは長さ 0.6~1.2 マイクロメートル、巾 0.6~0.7 マイクロメートルである。スポランギア及び運動性胞子は観察されなかった。

2) 各種培地上における生育状況 (27℃、3 週間)

| 培地 | 生育 | 気菌糸 | 基底菌糸 | 可溶性色素 |
|-----------|----|------|--------------|--------------|
| スターチ・イースト | 普通 | 普通、白 | 淡褐色 10YR 7/4 | なし |
| ISP No. 2 | 良好 | 普通、白 | 褐色 5YR 4/4 | 淡褐色 10YR 7/6 |
| ISP No. 3 | 良好 | 普通、白 | 淡黄色 2.5Y 8/8 | なし |
| ISP No. 4 | 良好 | 少量、白 | 淡褐色 2.5Y 8/4 | なし |
| ISP No. 5 | 良好 | 普通、白 | 淡黄色 5Y 9/4 | なし |
| ISP No. 6 | 普通 | なし | 濃褐色 10YR 2/2 | 濃褐色 10YR 3/2 |
| ISP No. 7 | 良好 | 普通、白 | 淡褐色 10YR 7/4 | 淡褐色 2.5Y 8/4 |
| ISP No. 8 | 普通 | なし | 淡黄色 5Y 9/4 | なし |

色調の記載は (財) 日本規格協会 標準色票 (光沢板) によった。

3) 炭素源の資化性 (ISP No. 9、27℃、3 週間)

| 炭素源 | 生育 |
|----------|----|
| L-アラビノース | 普通 |
| D-キシロース | 良好 |
| D-グルコース | 良好 |
| D-フルクトース | 良好 |
| シュクロース | 良好 |
| イノシトール | 良好 |
| L-ラムノース | 不良 |
| ラフィノース | 普通 |
| D-マンニトール | 良好 |
| D-ガラクトース | 良好 |

4) その他の生理的性質

1. ゼラチンの液化 (グルコース・ペプトン・ゼラチン培地)

液化しない。

2. スターチの加水分解

加水分解しない。

3. スキムミルクの凝固とペプトン化

凝固せずペプトン化する。

4. メラニン色素の産生

ISP No. 2, 6, 7で色素の産生がある。

5. 生育温度

27～37℃

ストレプトミセス sp. RK-1061 とストレプトミセス sp. SN-1061Mの K 1 培地におけるフラスコ培養での活性比較のデータを以下に示す。5日目と7日目の培養上清と菌体抽出物の *Mycobacterium phlei* に対する抗菌活性を比べると、後者には抗菌活性が認められるが前者には全く抗菌活性が認められない。従って、ストレプトミセス sp. SN-1061Mはストレプトミセス sp. RK-1061 よりも RK-1061物質を安定に且つ大量に生産する、より有用な菌株である。

| 培養 日数 | <i>Streptomyces</i> sp. RK-1061 (元株) | | | | <i>Streptomyces</i> sp. SN-1061M (変異株) | | | |
|----------|---|-----|----------|---|---|-----|----------|----|
| | 菌体量 (%) | pH | 阻止円 (mm) | | 菌体量 (%) | pH | 阻止円 (mm) | |
| | | | B | M | | | B | M |
| 3 日 | 33 | 7.8 | 0 | 0 | 48 | 6.1 | 0 | 0 |
| 5 日 | 44 | 7.2 | 0 | 0 | 71 | 5.1 | 0 | 14 |
| 7 日 | 29 | 8.0 | 0 | 0 | 67 | 5.5 | 15 | 25 |

(B : 培養上清、M : 菌体抽出物)

〔培養法及び精製法〕

次に本発明ストレプトミセス属に属し、リポシドマイシン類を産生する菌株の培養法及び培養して得られたリポシドマイシン類の単離精製法について説明する。

本発明の抗生物質リポシドマイシンRK-1061 類を得るにあたっては、ストレプトミセス属に属する上記抗生物質産生菌を、抗生物質を産生する通常の方法で培養する。培養の形態は、液体培養でも固体培養でもよく、工業的に有利に培養するためには、前記産生菌の孢子懸濁液又は培養液を培地に接種し、通気攪拌培養を行えばよい。

培地の栄養源としては特に限定されることはなく、微生物の培養に通常用いられる炭素源、窒素源その他を培地中に含有させることができる。炭素源としては、澱粉、デキストリン、グリセリン、グルコース、マルトース、キシロース、ラクトース、D-フラクトース、シュクロース、イノシトール、L-ラムノース、L-アラビノース、D-マンニトール、ラフィノース、サリシン、L-ソルボース、D-グルコサミン、また窒素源としては、小麦胚芽、マルトエキストラクト、ペプトン、大豆粉、肉エキス、米ぬか、麸、尿素、コーンステープリカー、アンモニウム塩、硝酸塩、その他の有機または無機の窒素化合物が用いられる。その他、無機塩類、たとえば食塩、磷酸塩類、カリウム、カルシウム、亜鉛、マンガン、鉄等の金属塩類等を適宜に添加してもよく、必要に応じて消泡剤として、動物油、植物油、鉱物油等を添加してもよい。培養温度、培養時間等の培養条件は使用菌の発育に適し、しかもリポシドマイシン類の産生が最高となるような条件が選ばれる。たとえば、培地のpHは4～9、特に6～7付近がよく、培養の適温は25～35℃程度がよい。しかし、これらの培養組成物、培地の水素イオン濃度、培養温度、攪拌条件などの培養条件は使用する菌株の種類や、外部の条件などに応じて好ましい結果が得られるように適宜調節されるべきであることはいうまでもない。

また、前述のように炭素源として特定の炭素源を用いると、R₃が硫酸基である

もの、あるいは水素原子であるものを、適宜選択して産生させることができる。

このようにして得られる培養物から、リポシドマイシン類を得るには、代謝産物を採るのに通常用いられる手段を適宜に利用して行なうことができる。たとえば、リポシドマイシン類と不純物との溶解度差を利用する手段、イオン結合力の差を利用する手段、吸着親和力の差を利用する手段、分子量の差を利用する手段等のいずれかを単独で、又は適宜組み合わせ、あるいは反復して使用される。

具体的には、リポシドマイシン類は、培養ろ液と菌体の両方に存在するが、菌体中に存在する活性区分は、含水アセトン抽出後アセトンを留去して得られる。これを前記培養ろ液と合わせ、溶剤抽出、シリカゲルクロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー等を組み合わせて精製すると、リポシドマイシン類を得る。溶剤抽出の溶剤としてはブタノールが、ゲルろ過クロマトグラフィーの担体としては、セファデックスLH-20 等が好適である。

得られた RK-1061類を、高速液体クロマトグラフィーに付すと、多成分のピークに分かれる。使用カラムは、逆相分配型のものが有利である。

得られたピークのうち、それぞれのリポシドマイシンに相当するピークを分取し、濃縮、脱塩、凍結乾燥することにより、純粋なりポシドマイシンをそれぞれ得る。

〔理化学的性状〕

本発明のリポシドマイシンRK-1061 類は以下の理化学的性状を有する。

- (1) 形状：各成分全て白色粉末
- (2) 分子量、及び分子式：質量分析(FAB-MS)と高分解能質量分析(HRFAB-MS)により得られた各成分の分子量、分子式を第1表に示す。

第 1 表

| 化合物 | 分子式 | R ₁ | 分子量 |
|---|--|---------------------------------|------|
| (I) タイプI (硫酸基、3-メチルグルタル酸残基共に有するもの) | | | |
| ① Z | : C ₄₂ H ₆₅ N ₅ O ₂₁ S | C ₁₁ H ₂₁ | 1007 |
| ② L | : C ₄₄ H ₇₁ N ₅ O ₂₁ S | C ₁₃ H ₂₇ | 1037 |
| ③ M | : C ₄₄ H ₇₁ N ₅ O ₂₁ S | C ₁₃ H ₂₇ | 1037 |
| ④ K | : C ₄₆ H ₇₁ N ₅ O ₂₁ S | C ₁₅ H ₂₇ | 1061 |
| ⑤ N | : C ₄₆ H ₇₃ N ₅ O ₂₁ S | C ₁₅ H ₂₉ | 1063 |
| (II) タイプII(硫酸基は有するが、3-メチルグルタル酸残基が無いもの) | | | |
| ① A - (II) | : C ₃₈ H ₅₇ N ₅ O ₁₇ S | C ₁₅ H ₂₅ | 887 |
| ② C - (II) | : C ₃₆ H ₅₇ N ₅ O ₁₇ S | C ₁₃ H ₂₅ | 863 |
| (III) タイプIII(硫酸基が無く、3-メチルグルタル酸残基を有するもの) | | | |
| ① X - (III) | : C ₄₁ H ₆₅ N ₅ O ₁₈ | C ₁₀ H ₂₁ | 915 |
| ② Y - (III) | : C ₄₂ H ₆₃ N ₅ O ₁₈ | C ₁₁ H ₁₉ | 925 |
| ③ Z - (III) | : C ₄₂ H ₆₅ N ₅ O ₁₈ | C ₁₁ H ₂₁ | 927 |
| ④ C - (III) | : C ₄₂ H ₆₇ N ₅ O ₁₈ | C ₁₁ H ₂₃ | 929 |
| ⑤ V - (III) | : C ₄₄ H ₆₅ N ₅ O ₁₈ | C ₁₃ H ₂₁ | 951 |
| ⑥ A - (III) | : C ₄₄ H ₆₇ N ₅ O ₁₈ | C ₁₃ H ₂₃ | 953 |
| ⑦ G - (III) | : C ₄₄ H ₆₉ N ₅ O ₁₈ | C ₁₃ H ₂₅ | 955 |
| ⑧ M - (III) | : C ₄₄ H ₇₁ N ₅ O ₁₈ | C ₁₃ H ₂₇ | 957 |
| ⑨ K - (III) | : C ₄₆ H ₇₁ N ₅ O ₁₈ | C ₁₅ H ₂₇ | 981 |
| ⑩ N - (III) | : C ₄₆ H ₇₃ N ₅ O ₁₈ | C ₁₅ H ₂₉ | 983 |
| (IV) タイプIV(硫酸基、3-メチルグルタル酸残基共に無いもの) | | | |
| ① A - (IV) | : C ₃₈ H ₅₇ N ₅ O ₁₄ | C ₁₅ H ₂₅ | 807 |
| ② C - (IV) | : C ₃₆ H ₅₇ N ₅ O ₁₄ | C ₁₃ H ₂₅ | 783 |

(3) 融点: 各成分全て明確な融点を示さず、150℃～250℃で分解する。

(4) 比旋光度:

リポシドマイシン A - (III): $[\alpha]_D^{24} = +22^\circ$ (c 0.1、50%メタノール)

リポシドマシイン Z - (III): $[\alpha]_D^{24} = +20^\circ$ (c 0.1、50%メタノール)

(5) 紫外外部吸収スペクトル：各成分全て 261~263nm に極大吸収（50%メタノール中）を有する。

(6) 赤外部吸収スペクトル(KBr錠)：リポシドマイシンZ-(III)の赤外部吸収スペクトルを図1に示す。

(7) $^1\text{H-NMR}$ スペクトル：500メガヘルツ(MHz)、重メタノール溶液中にて室温で測定した。リポシドマイシンZ(図2)、L(図3)、M-(図4)、K(図5)、N(図6)、A-(II)(図7)、X-(III)(図8)、Y-(III)(図9)、Z-(III)(図10)、C-(III)(図11)、V-(III)(図12)、A-(III)(図13)、G-(III)(図14)、M-(III)(図15)、K-(III)(図16)、N-(III)(図17)、A-(IV)(図18)をそれぞれ示す。

リポシドマイシンCの硫酸基の無いタイプであるC-(III)の分子式 $\text{C}_{42}\text{H}_{67}\text{N}_{10}\text{O}_{16}$ は、リポシドマイシンBの硫酸基の無いタイプ(CAS登録番号:113378-45-3)と同じであるが、図11の $^1\text{H-NMR}$ により、脂肪側鎖の末端がメチル基1個分(t , 0.89 ppm、3H)で、リポシドマイシンBの硫酸基の無いタイプ(末端のメチル基が2個分、イソタイプ)とは明らかに区別される。

(8) 溶解性：各成分全てメタノール、ジメチルスルホキシド、水に可溶、ヘキサン、クロロホルムに不溶。

(9) TLCによるRf値：シリカゲルArt. 5715(メルク社)の薄層クロマトグラフィーで展開溶媒としてブタノール-酢酸-水(4:1:2)で展開した時のRf値は、

硫酸基を有する化合物 (タイプ(I)、(II)) : 0.35

硫酸基を有さない化合物 (タイプ(III)、(IV)) : 0.41

(10) HPLCによる保持時間：2種の条件下での各成分の保持時間(Rt)を第2表に示す。

第 2 表

| | 保持時間 (分) | |
|--|----------|------|
| | 条件 1 | 条件 2 |
| (I) タイプI (硫酸基、3-メチルグルタル酸残基共に有するもの) | | |
| ① Z | 14.5 | |
| ② L | | 8.2 |
| ③ M | | 8.8 |
| ④ K | 51.8 | 7.0 |
| ⑤ N | | 11.0 |
| (II) タイプII (硫酸基は有するが、3-メチルグルタル酸残基が無いもの) | | |
| ① A - (II) | 16.6 | |
| (III) タイプIII (硫酸基が無く、3-メチルグルタル酸残基を有するもの) | | |
| ② X - (III) | 13.9 | |
| ③ Y - (III) | 9.1 | |
| ④ Z - (III) | 15.8 | |
| ⑤ C - (III) | 25.9 | |
| ⑥ V - (III) | 12.6 | |
| ⑦ A - (III) | 21.5 | |
| ⑧ G - (III) | 41.9 | 6.6 |
| ⑨ M - (III) | | 11.0 |
| ⑩ K - (III) | | 8.3 |
| ⑪ N - (III) | | 14.0 |
| (IV) タイプIV (硫酸基、3-メチルグルタル酸残基共に無いもの) | | |
| ① A - (IV) | 18.8 | |

条件 1 : 40% CH₃ CN-0.1% DEA-HCOOH(pH4), 254nm, 1.5ml/min, PEGASIL ODS
(4.6φx250mm、センシュエ科学社)

条件 2 : 50% CH₃ CN-0.1% DEA-HCOOH(pH4), 254nm, 1.5ml/min, PEGASIL ODS
(4.6φx250mm、センシュエ科学社)

(11) 脂肪側鎖 R₁ の構造

タイプ (I)

Z : 5 位と 6 位に 2 重結合

L : イソ型

M : ノルマル型

K : 9 位と 10 位、12 位と 13 位に 2 重結合

N : 9 位と 10 位に 2 重結合

タイプ (Ⅲ)

- Y- (Ⅲ) : 5 位と 6 位、8 位と 9 位に 2 重結合
- Z- (Ⅲ) : 5 位と 6 位に 2 重結合
- A- (Ⅲ) : 7 位と 8 位、10 位と 11 位に 2 重結合
- G- (Ⅲ) : 7 位と 8 位に 2 重結合
- M- (Ⅲ) : ノルマル型
- K- (Ⅲ) : 9 位と 10 位、12 位と 13 位に 2 重結合
- N- (Ⅲ) : 9 位と 10 位に 2 重結合

実施例

次に本発明を実施例により説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

〔実施例 1〕

R₃が硫酸基と水素原子である RK-1061 (硫酸基がある RK-1061 と硫酸基がない RK-1061) の製造

寒天斜面培地で培養した前記 RK-1061 株 (FERM P-8278) を、グルコース 2 %、可溶性澱粉 1 %、肉エキス 0.1 %、酵母 0.4 %、大豆粉 2.5 %、食塩 0.2 %、第二リン酸カリ 0.005 % の組成より成る液体培地 (pH 6.8) 70 ml を含む 500 ml の三角フラスコに接種する。28℃ で 2 日間培養した。この培養液 1 ml を同様の培地を含むフラスコに接種し 48 ~ 72 時間培養した。さらにこの培養液 140 ml を同様の培地を 18 リットル含む 30 リットル容積のジャーファーマンターに接種した。これを通気量 18 リットル / 分、攪拌回転数 350 rpm で 28℃、65 ~ 90 時間、pH が 8.4 を越えるまで通気攪拌培養を行なった。培養終了後、遠心により培養上清 (pH 8.8、Mycobacterium phlei に対する阻止円の大きさ 20.2 mm) と菌体 (2.9 kg、Mycobacterium phlei に対する阻止円の大きさ 24.3 mm) とに分け、菌体はアセトン 5 リットルを加えて一晩抽出した。抽出液のアセトンを減圧濃縮により流去して得られた水溶液を培養上清と合わせ、これに等量のブタノールを加えて 3 回抽出を行った。ブタノール層を減圧濃縮すると約 60 g の粗抽出物が得られた。これを 80 ml のメタノールで溶解した後 240 ml のクロロホルムを加えて、クロロホルム-メタノール (3

：1) で飽和しているシリカゲルカラム(8×12cm, メルク社、70～230・メッシュ)にチャージし、不純物をクロロホルム-メタノール(2:1)とクロロホルム-メタノール(1:1)で除いたのち、クロロホルム-メタノール(1:2)と(1:3)で活性物質を溶出させた。この溶出液を減圧濃縮すると約14gの粗抽出物が得られた。これを20mlのメタノールに溶解してメタノールで飽和したLH-20 カラム(3×79cm, ファルマシア社)に供し活性画分10.3gを得た。これをさらにブタノール-メタノール-水(4:1:2)で飽和しているシリカゲルカラム(8×12cm)に供し、同様の溶媒にて展開し、活性画分を得た(6.5g)。

次にこれをHPLCに供して分取を行った。1回目はセンシュ-バックODS(20φ×250mm, ODS-5251-SS, センシュ-科学社)、アセトニトリル-0.1%ジエチルアミン・ギ酸(pH4)(40:60)、流速10ml/分にて6画分に分け、続いて同様のカラムと流速でアセトニトリル-0.1%ジエチルアミン・ギ酸(pH4)(60:40)の条件でさらに6画分に分けた。これらをそれぞれ減圧濃縮し、さらにカプセルバックODS(20φ×250mm, SG-120、資生堂社)を用いて同様の条件にて再分画した。このようにして得られた、各リボシドマイシン画分を減圧濃縮にてアセトニトリルを除去したのち、脱塩のために水を加えてMCIGEL(1×5cm, 三菱化成社)に供した。十分に水洗したのち、50%アセトンにて活性物質を溶出させ、減圧濃縮、凍結乾燥を行いリボシドマイシン類の白色粉末を得た。

〔実施例2〕

R₃が硫酸基と水素原子である RK-1061 (硫酸基がある RK-1061と硫酸基がない RK-1061)の製造

寒天斜面培地で培養した前記 SN-1061M 株(FERM BP-5800)を、グルコース2%、可溶性澱粉1%、肉エキス0.1%、酵母0.4%、大豆粉2.5%、食塩0.2%、第二リン酸カリ0.005%の組成より成る液体培地(pH6.7)(C4培地)70mlを含む

500mlの三角フラスコに接種する。27℃で2日間培養した。この培養液1mlを同様の培地を含むフラスコに接種し5日間培養した。培養液を遠心し、培養上清と菌体とに分け菌体量とpHを測定し、菌体をアセトンにて抽出した後、抗菌活性を調べた。抗菌活性は、Mycobacterium phleiとEscherichia coli BEを用い、8mm径のペーパーディスクに40 μ lの培養液をしみ込ませて最適条件にて培養し、生じた阻止円の大きさを測定した。

さらに、培養上清と菌体抽出物をそれぞれブタノールで抽出後濃縮乾固し、1/10容のメタノールに溶解した後、HPLCとTLCにて分析した。HPLCは、アセトニトリル-0.1%ジエチルアミン-ギ酸(pH4.0)(45:55)を溶媒としたカプセルパックODS(4.6 ϕ ×250mm、資生堂社)を用い、流速1.5ml/分、検出波長254nmの条件下で行なった。TLCは、シリカゲル Art. 5715(0.25mm、メルク社)で、ブタノール：酢酸：水=4：1：2を展開溶媒として展開した。各菌に対する阻止円の結果を第3表に、TLCの結果を第19図に、HPLCの結果を第20図にそれぞれ示す。又、グルコースをマルトースに変更した場合も同様に行なった。

〔実施例3〕

R₃が水素原子であるRK-1061(硫酸基がないRK-1061)の製造

寒天斜面培地で培養した SN-1061M 株を、実施例2に示した培地(C4培地)の炭素源であるグルコースを、キシロース、ラクトース、D-フラクトース、シュクロース、イノシトール及びD-マンニトールのいずれかに変更した液体培地70mlを含む500ml容の三角フラスコに接種した。これを27℃、200回転/分で2～4日培養し、培養液2mlを同様の培地組成の三角フラスコに接種し、同様の条件で5日間培養したところ、硫酸基を持たない活性成分を特異的に産生することが確認された。培養液を遠心し、培養上清と菌体とに分け菌体量とpHを測定し、菌体をアセトンにて抽出した後、抗菌活性を調べた。抗菌活性は、Mycobacterium phleiとEscherichia coli BEを用い、8mm径のペーパーディスクに40 μ lの

培養液をしみ込ませて最適条件にて培養し、生じた阻止円の大きさを測定した。

さらに、培養上清と菌体抽出物をそれぞれブタノールで抽出後濃縮乾固し、1/10容のメタノールに溶解した後、HPLCとTLCにて分析した。HPLCは、アセトニトリル-0.1%ジエチルアミン・ギ酸(pH4.0)(45:55)を溶媒としたカプセルパックODS(4.6φ×250mm、資生堂社)を用い、流速1.5ml/分、検出波長254nmの条件下で行った。TLCは、シリカゲル Art. 5715(0.25mm、メルク社)で、ブタノール:酢酸:水=4:1:2を展開溶媒として展開した。各菌に対する阻止円の結果を第3表に、TLCの結果を第19図にそれぞれ示す。

〔実施例4〕

R₃が水素原子であるRK-1061(硫酸基がないRK-1061)の製造

寒天斜面培地で培養した SN-1061M 株を、シュクロース(和光純薬社)40g、大豆粉(豊年製油社)30g、小麦胚芽(シグマ社)またはマルトエキストラクト(ディフコ社)20g、塩化ナトリウム(和光純薬社)6gの組成でpHを7.0に調整した培地(KI培地)70mlを含む500ml容フラスコに接種した。これを27℃、200回転/分で2~4日培養し、培養液2mlを同様の培地組成の三角フラスコに接種し、同様の条件で5日間培養したところ、硫酸基を持たない活性成分を特異的に産生することが確認された。培養液を遠心し、培養上清と菌体とに分け菌体量とpHを測定し、菌体をアセトンにて抽出した後、抗菌活性を調べた。抗菌活性は、Mycobacterium phleiとEscherichia coli BEを用い、8mm径のペーパーディスクに40μlの培養液をしみ込ませて最適条件にて培養し、生じた阻止円の大きさを測定した。

さらに、培養上清と菌体抽出物をそれぞれブタノールで抽出後濃縮乾固し、1/10容のメタノールに溶解した後、HPLCとTLCにて分析した。HPLCは、アセトニトリル-0.1%ジエチルアミン・ギ酸(pH4.0)(45:55)を溶媒としたカプセルパックODS(4.6φ×250mm、資生堂社)を用い、流速1.5ml/分、検

出波長254nmの条件下で行った。TLCは、シリカゲル Art. 5715 (0.25mm、メルク社)で、ブタノール：酢酸：水＝4：1：2を展開溶媒として展開した。各菌に対する阻止円の結果を第3表に、TLCの結果を第19図に、HPLCの結果を第21図にそれぞれ示す。

第 3 表

| 炭 素 源 | 菌体量 (wet vol(%)) | pH | 阻止円 (mm) | | | |
|------------|---------------------|-----|----------|--------|--------|------|
| | | | B(BE)M | | B(Ph)M | |
| (C4培地) | 42 | | + | + | 16.6 | 19.7 |
| (K1培地) | 51 | | 9.8 | 11.6 | 11.9 | 20.4 |
| A マルトース | 41 | 7.9 | + | 0 | 13.9 | 17.7 |
| B キシロース | 44 | 6.5 | 10.2 | (12.1) | 16.0 | 20.8 |
| C ラクトース | 45 | 7.5 | 11.9 | 11.4 | 18.9 | 22.0 |
| D D-フラクトース | 46 | 7.8 | 12.2 | 11.5 | 20.6 | 23.3 |
| E シュクロース | 49 | 7.9 | 13.6 | 12.7 | 23.4 | 23.8 |
| F イノシトール | 35 | 7.9 | 13.1 | 10.7 | 20.2 | 20.0 |
| G L-ラムノース | 25 | 8.4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| H L-アラビノース | 26 | 4.8 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| I D-マンニトール | 39 | 7.8 | 13.2 | 11.5 | 20.2 | 21.1 |
| J ラフィノース | 18 | 8.6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| K サリシン | 13 | 8.6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| L L-ソルボース | 20 | 8.6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| M D-グルコサミン | 6 | 3.7 | 0 | 0 | 0 | 0 |

BE : Escherichia coli

BE 1186

B : 培養上清

Ph : Mycobacterium phlei

IFO 3158

M : 菌体抽出物

〔実施例 5〕

R₃が水素原子であるRK-1061(硫酸基がないRK-1061)の製造

寒天斜面培地で培養した前記SN-1061M株(FERM BP-5800)を、K1培地70mlを含む500mlの三角フラスコに接種する。27℃、2～3日間培養した液1mlを同様の培地を含むフラスコに接種し48～72時間培養した液140mlを同様の培地を18L含

む 30L容積のジャーファメンターに接種した。これを通気量 18L/分、攪拌回転数350rpmで27℃、5～8日間通気攪拌培養を行う。培養終了後、遠心により菌体画分を得、アセトンを加えて一晚抽出した。抽出液のアセトンを減圧濃縮により除去して得られた水溶液に等量のブタノールを加えて3回抽出を行った。ブタノール層を減圧濃縮すると 30.4gの粗抽出物が得られた。これを80mlのメタノールで溶解した後 240mlのクロロホルムを加えて50gのシリカゲルと混合し、クロロホルム-メタノール(3:1)で飽和しているシリカゲルカラム(8×18cm)にチャージし、不純物をクロロホルム-メタノール(2:1)と(1:1)で除いたのち、活性物質をクロロホルム-メタノール(1:2)と(1:3)で溶出した。これを減圧濃縮すると 7.73gの粗抽出物が得られた。これを100mg/mlの濃度にてアセトニトリル-0.1%ジエチルアミン・ギ酸(pH4)(40:60)に溶解した後遠心により上清を得た。次にこれをHPLCに供して分取を行った。1回目はセンシティブパックODS(20φ×250mm)、アセトニトリル-0.1%ジエチルアミン・ギ酸(pH4)(40:60)(50:50)(60:40)のステップワイズにて、流速10ml/分に分け、続いてカプセルパックODS(20φ×250mm)にて、アセトニトリル-0.1%ジエチルアミン・ギ酸(pH4)(37.5:62.5)、(42.5:57.5)、(50:50)のステップワイズにて各成分を得た。これらの各リポシドマイシン画分をそれぞれ減圧濃縮してアセトニトリルを除去したのち、脱塩のために水を加えてMCIGEL(1×5cm)に供した。十分に水洗したのち、70%アセトンにて活性物質を溶出させ、減圧濃縮、凍結乾燥を行いリポシドマイシン類の白色粉末を得た。この条件にて、リポシドマイシンC-(Ⅲ)とM-(Ⅲ)がメイン成分としてそれぞれ51.8mg、34.1mg得られた。

〔生物活性〕

(1) 抗菌活性

それぞれの濃度の被検物質のメタノール溶液を、8mm 径のペーパーディスク (Thick, 東洋濾紙社) にしみ込ませ乾燥させた後、各菌のプレート上に載せた。各菌の最適条件下で培養後、生じた阻止円の直径を計測した。その結果を、第4表、第5表及び第6表にそれぞれ示す。

第 4 表

| 菌 名 | 化 合 物 | | | | | | | | | | | |
|--|-------|--------|------|----------------|---------------|--------|------|--------|------|--------|---|--------|
| | A | A(III) | C | C(III) | M | M(III) | K | K(III) | N | N(III) | Z | Z(III) |
| <i>Escherichia coli</i> AB 1157 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Escherichia coli</i> BB 1186 | + | 17.8 | 0 | 14.3 | 0 | (+) | (+) | 13.5 | 0 | 15.2 | - | 18.8 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> IFO 12732 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Bacillus subtilis</i> IFO 3513 | 0 | 21.0 | 0 | 17.8 (23.7) | 9.7 (13.0) | 14.8 | (+) | 13.0 | (+) | 12.9 | 0 | 22.2 |
| <i>Mycobacterium phlei</i> IFO 3158 | 18.9 | 24.8 | 22.1 | 30.3 | 27.2 | 25.7 | 28.6 | 23.3 | 23.1 | 20.8 | - | 26.3 |
| <i>Candida albicans</i> IFO 5994 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

(20 μ g/disc、阻止円: mm)

()は部分阻止を表す。

-は未測定

第 5 表

| 化合物 | サンプル | M. Phleiに対する 阻止円(2 μ g/disc, mm) | |
|---|---------|---|------|
| (I) タイプI (硫酸基、3-メチルグルタル酸基共に有するもの) | | | |
| リポシドマイシン | A | 0 | 既知物質 |
| | B | 0 | |
| | C | 0 | |
| | Z | 0 | |
| | L | 14.08 | |
| | M | 16.86 | |
| | K | 13.15 | |
| | N | 11.59 | |
| (II) タイプII(硫酸基は有するが、3-メチルグルタル酸基が無いもの) | | | |
| | A-(II) | 0 | |
| (III) タイプIII(硫酸基が無く、3-メチルグルタル酸基共に有するもの) | | | |
| | X-(III) | 13.23 | |
| | Y-(III) | 0 | |
| | Z-(III) | 13.74 | |
| | C-(III) | 16.21 | |
| | V-(III) | — | |
| | A-(III) | 11.62 | |
| | G-(III) | 16.68 | |
| | M-(III) | 15.49 | |
| | K-(III) | 12.27 | |
| | N-(III) | 11.15 | |
| (IV) タイプIV(硫酸基、3-メチルグルタル酸基共に無いもの) | | | |
| | A-(IV) | 19.90 | |

—は未測定を示す。

第 6 表

| 化 合 物 | A | A-(II) | A-(III) | A-(IV) |
|---|---|--------|---------|--------|
| 硫 酸 基 | ○ | ○ | X | X |
| 3-メチルグルタル酸 | ○ | X | ○ | X |
| <i>M. phlei</i> に対する阻止 円 (2 μ g/disc mm) | 0 | 0 | 14.3 | 23.4 |

(2) ペプチドグリカン合成阻害活性

大腸菌から粗酵素を枯草菌から基質UDP-MurNAc-pentapeptideを文献(J. Biol. Chem., 243, 3180(1968))に従って調製した。5 μ l の1M Tris-HCl pH7.5、10 μ l の0.1M MgCl₂、5 μ l の2mM UDP-MurNAc-pentapeptide、5 μ l の酵素(15 mg/ml のタンパク質濃度)と5 μ l のサンプル、5 μ l のUDP-[U-³H]GlcNAc(10 μ Ci/ml, 25.8 Ci/mmol, デュポン社)、15 μ l の水を加えて37℃、60分反応を行ない反応液を1mlの5% TCAに加えた。氷冷後GF/Cのガラスフィルター(2.4cm, ワットマン社)にトラップした後シンチレーターを加えてカウントを測定した。コントロールのカウントとの比較により阻害%を算出した。その結果を、第7表に示す。

(3) 細胞毒性試験

BALB/3T3細胞を10% FBSを添加したDMEM培地(ギブコ社)、5% CO₂、37℃にて96穴プレートに1 \times 10⁵ cells/mlの濃度で100 μ l 接種した。1晩培養後、メタノールに溶解した被検物質を加え、さらに3日間培養し、2.5 mg/ml のMTT試薬(シグマ社)を10 μ l 加えてさらに4時間培養した。培養上澄みを除去後、100 μ l のDMSOを加えて一晩放置し540nmの吸光度を測定することで生細胞を検出した。その結果を、第8表に示す。

第 7 表

| 化 合 物 | A | A-(II) | A-(III) | A-(IV) | TM |
|--|----|--------|---------|--------|----|
| ペプチドグリカン合成 阻害活性、阻害％ (0.1 μ g/ml) | 95 | 90 | 96 | 94 | 10 |

TM :Tunicamycin

第 8 表

| 化 合 物 | A | A-(II) | A-(III) | A-(IV) | TM |
|--|------|--------|---------|--------|------|
| BALB/3T3細胞に対する 細胞毒性値 (IC ₅₀ , μ g/ml) | > 25 | > 25 | > 25 | > 25 | 0.05 |

TM :Tunicamycin

産業上の利用可能性

以上詳細に説明したとおり、本発明により新規な抗生物質リポシドマイシン類と、その塩が提供され、またリポシドマイシン類の製造法が提供された。本発明による抗生物質リポシドマイシン類は細胞に対する毒性が極めて弱く、ペプチドグリカン合成を極めて強く阻害することにより抗菌活性を示す。

微生物への言及

1. Streptomyces sp. SN-1061M

寄託機関：通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

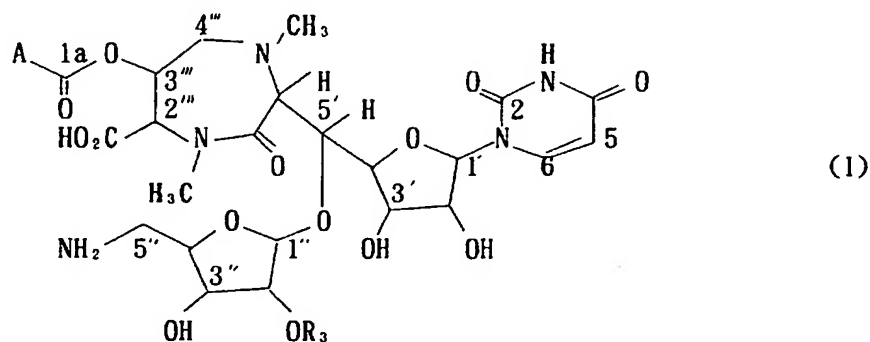
住 所：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号

寄託日：平成9年1月28日

受託番号：FERM BP-5800

請求の範囲

1. 次の一般式(I) で示される抗生物質RK-1061 類及びその薬理的に許容される塩。

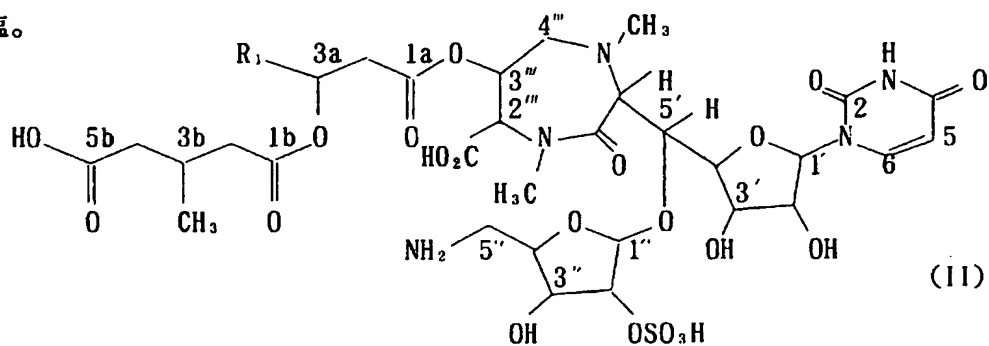


式中、A は R_1 又は $R_1CH(OR_2)CH_2$ を示す。

R_2 は3-メチルグルタル酸残基($-CO-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-COOH$)を示す。また R_3 は水素原子(H) または硫酸基($-SO_3H$)を示す。

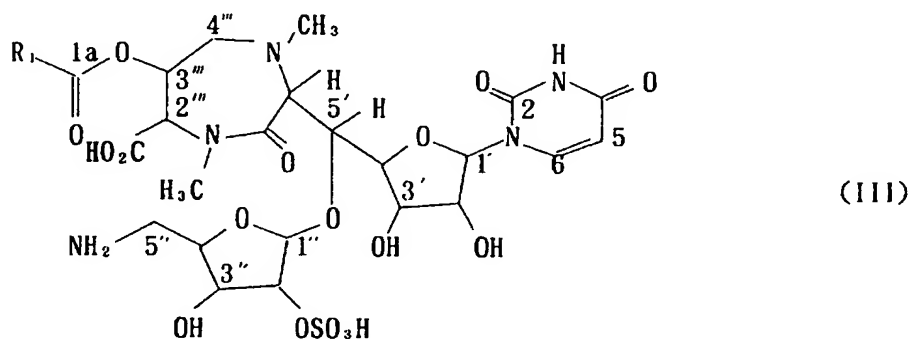
$R_1CH(OR_2)CH_2$ のとき、 R_1 は C_nH_{2n+1} (n は 1~20 の整数を示す)、 C_nH_{2n-1} (n は 2~21 の整数を示す) または C_nH_{2n-3} (n は 3~22 の整数を示す) であり、 R_1 のとき、 R_1 は C_nH_{2n-1} (n は 2~21 の整数を示す)、 C_nH_{2n-3} (n は 3~22 の整数を示す) または C_nH_{2n-5} (n は 4~23 の整数を示す) である。

2. 次の式 (II) で表される、抗生物質RK-1061 類及びその薬理的に許容される塩。



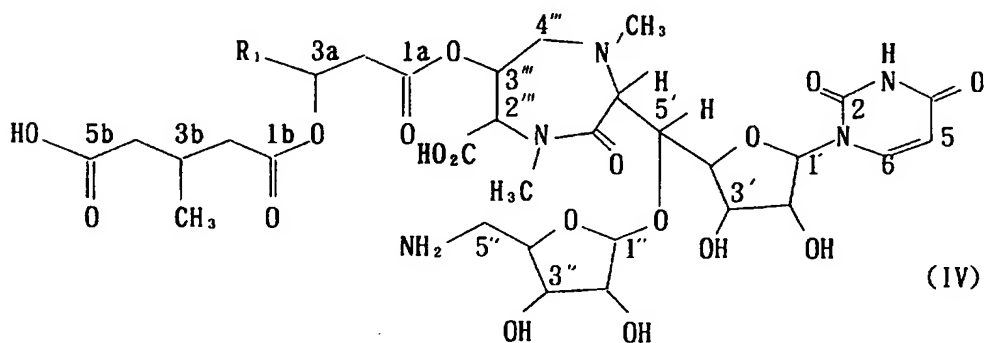
(R_1 は、 C_nH_{2n+1} (ただし、 n は1～20の整数を示す)、 C_nH_{2n-1} (ただし、 n は2～21の整数を示す)または C_nH_{2n-3} (ただし、 n は3～22の整数を示す)を示す。)

3. 次の式(III)で表される、抗生物質RK-1061類及びその薬理的に許容される塩。



(R_1 は、 C_nH_{2n-1} (ただし、 n は2～21の整数を示す)、 C_nH_{2n-3} (ただし、 n は3～22の整数を示す)または C_nH_{2n-5} (ただし、 n は4～23の整数を示す)を示す。)

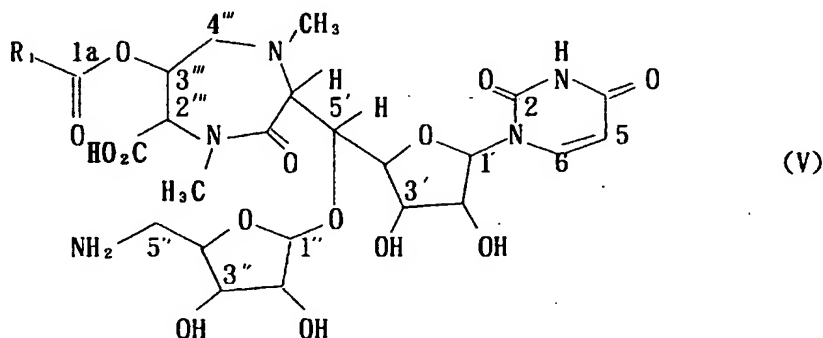
4. 次の式(IV)で表される、抗生物質RK-1061類及びその薬理的に許容される塩。



(R_1 は、 C_nH_{2n+1} (ただし、 n は1～20の整数を示す)、 C_nH_{2n-1} (ただし、

nは2～21の整数を示す) または C_nH_{2n-3} (ただし、 nは3～22の整数を示す) を示す。)

5. 次の式(V) で表される、抗生物質RK-1061 類及びその薬理的に許容される塩。



(R_1 は、 C_nH_{2n-1} (ただし、 n は2～21の整数を示す)、 C_nH_{2n-3} (ただし、 n は3～22の整数を示す) または C_nH_{2n-5} (ただし、 n は4～23の整数を示す)を示す。)

6. ストレプトミセス属に属し、抗生物質RK-1061 類あるいはその塩を産生することができる微生物を培地に培養し、該抗生物質あるいはその塩を産生させ、その培養物からこれ採取することを特徴とする抗生物質RK-1061 類あるいはその薬理的に許容される塩の製造法。

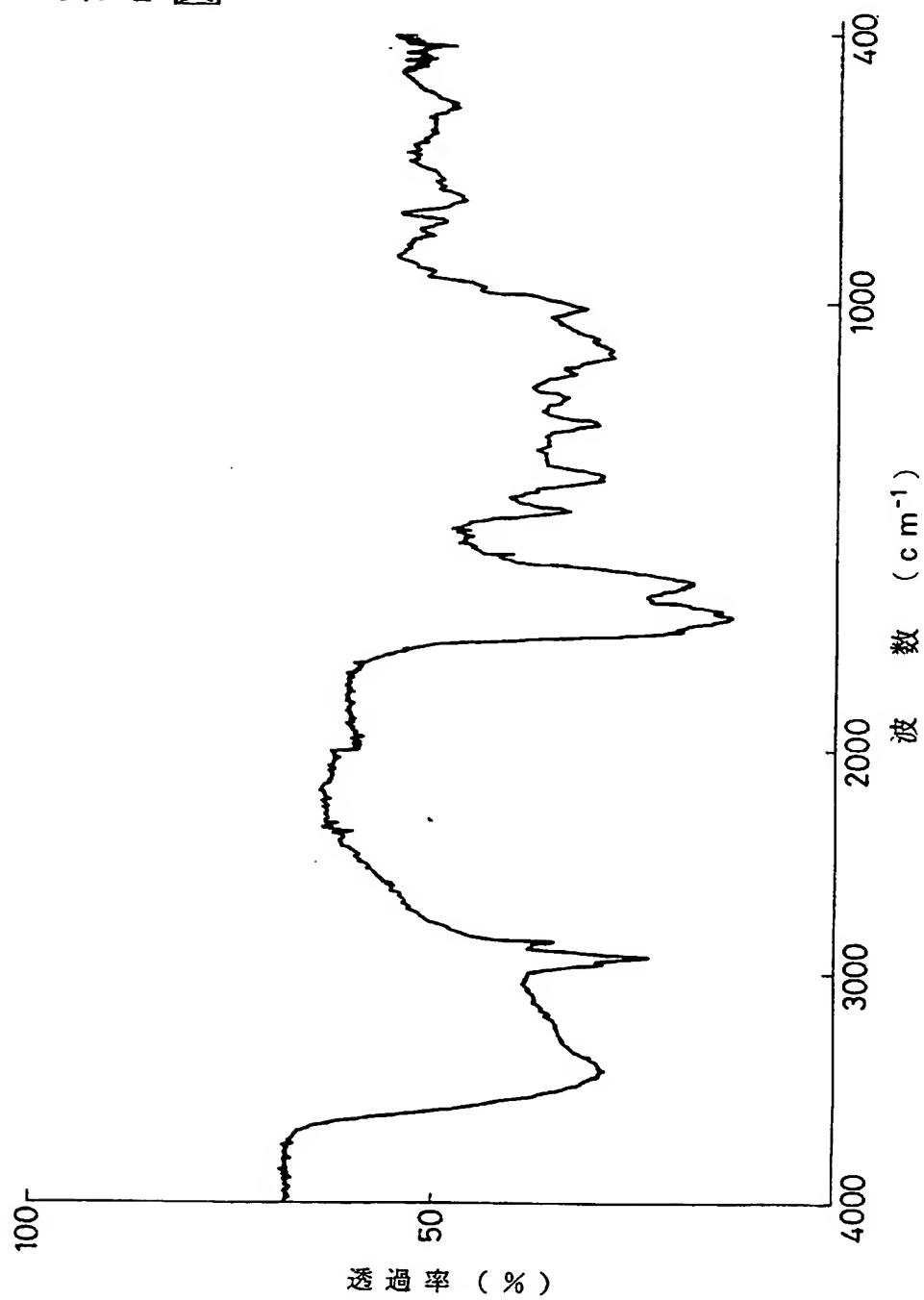
7. ストレプトミセス属に属し、抗生物質RK-1061 類あるいはその塩を産生することのできる微生物がストレプトミセス sp. RK-1061 (Streptomyces sp. RK-1061)(FERM P-8278)またはストレプトミセス sp. SN-1061M (FERM BP-5800)である請求項6記載の抗生物質RK-1061 類あるいはその薬理的に許容される塩の製造法。

8. 培地の炭素源としてグルコースまたはマルトースを用い、R₃が硫酸基である抗生物質 RK-1061類あるいはその塩を産生させる請求項 6 または 7 記載の抗生物質 RK-1061類あるいはその薬理的に許容される塩の製造法。

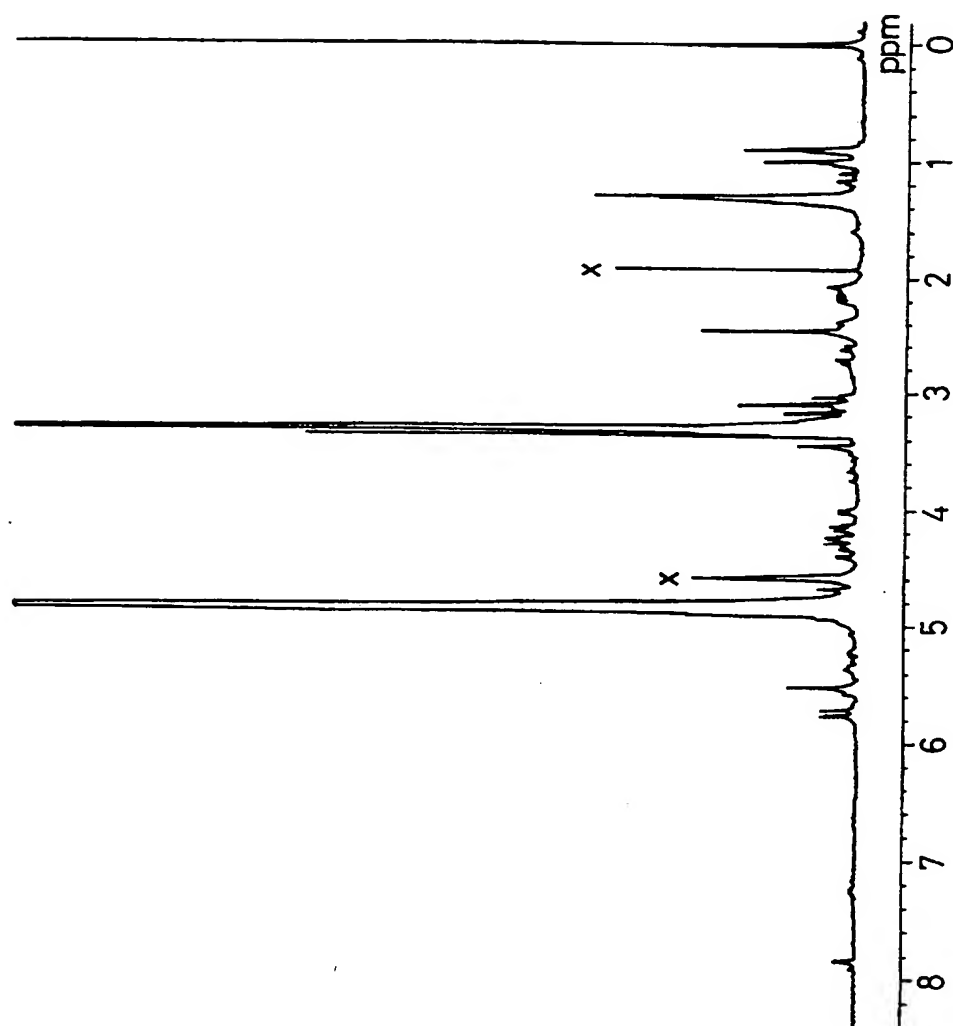
9. 培地の炭素源としてキシロース、ラクトース、D-フラクトース、シュクロース、イノシトール及びD-マンニトールよりなる群から選択される少なくとも1種の炭素源を用い、また窒素源として、小麦胚芽またはマルトエキストラクトを用い、R₃が水素原子である抗生物質 RK-1061類あるいはその塩を産生させる請求項6～8のいずれかに記載の抗生物質RK-1061 類あるいはその薬理的に許容される塩の製造法。
10. ストレプトミセス属 (Streptomyces属に属し、リボシドマイシンRK-1061類産生能を有する菌株。
11. ストレプトマイセス・エスピー・SN-1061M (Streptomyces SP. SN-1061M) (FERM BP-5800)である請求項10記載の菌株。

1 / 2 1

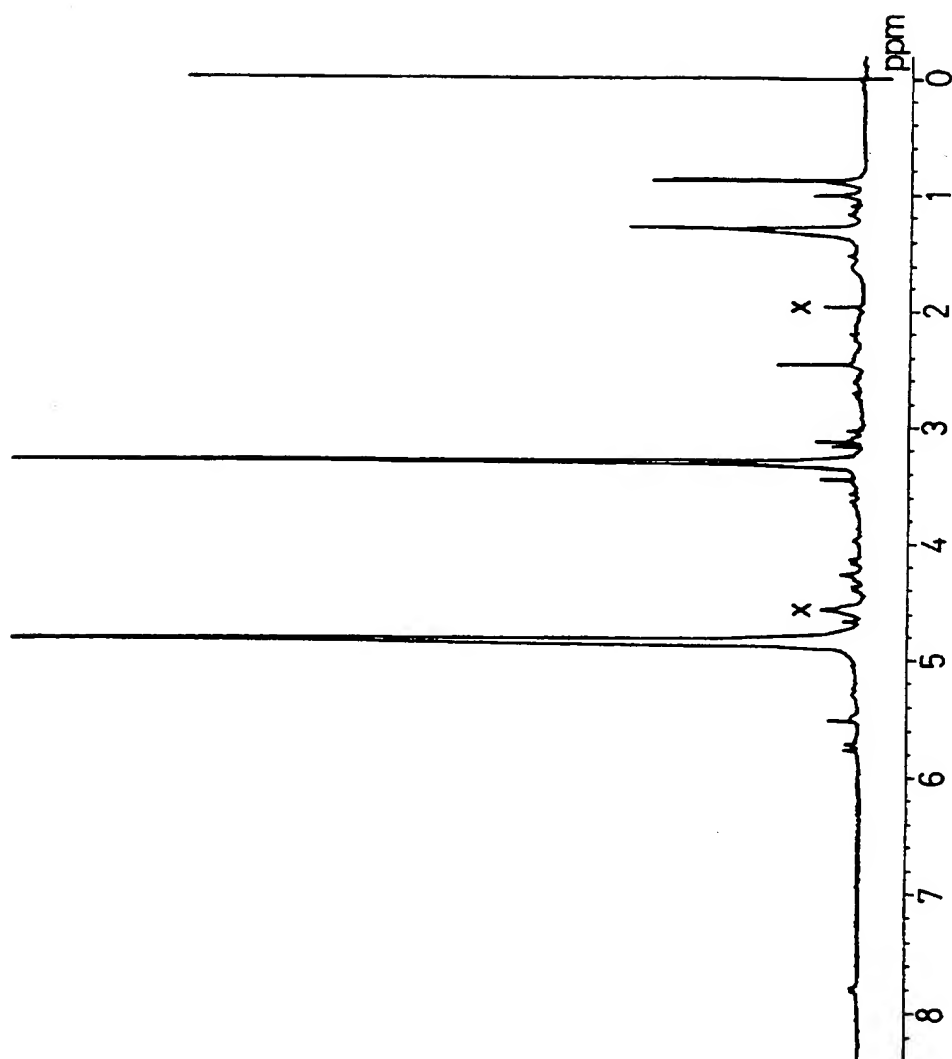
第 1 図



第 2 図

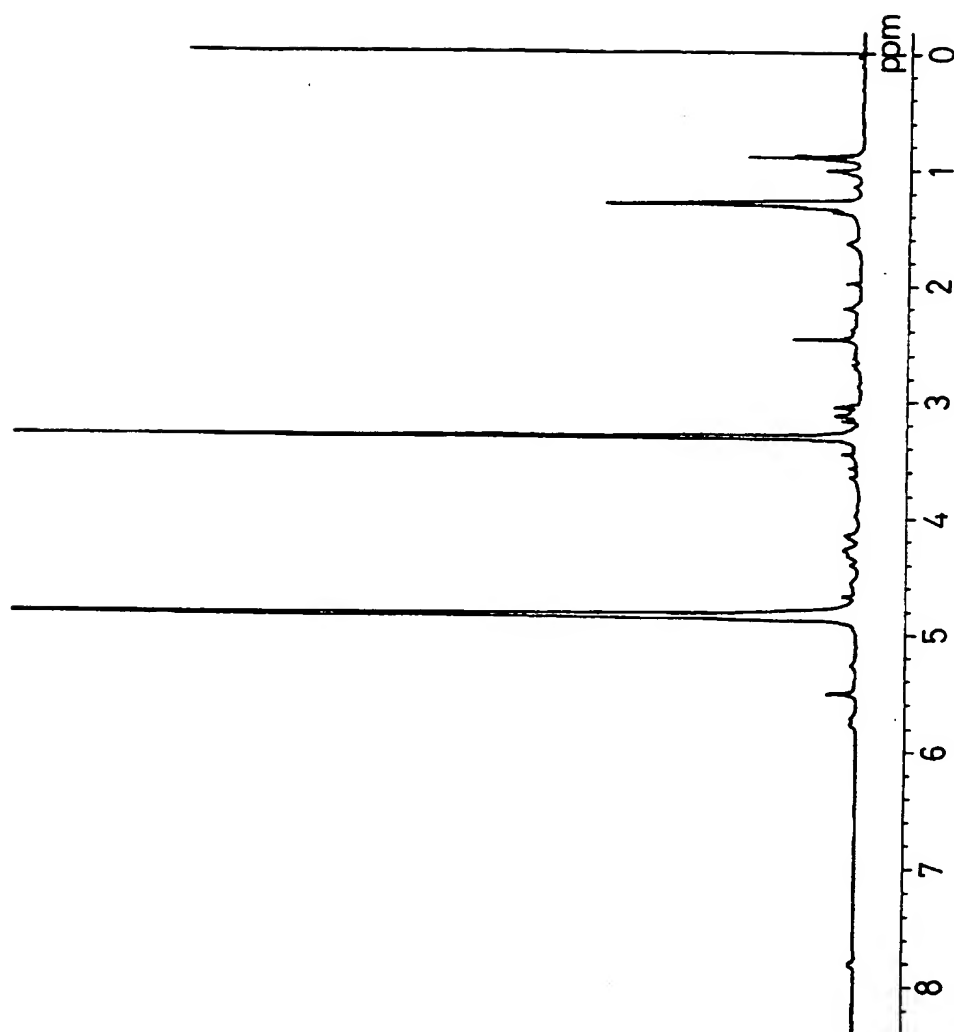


第 3 図

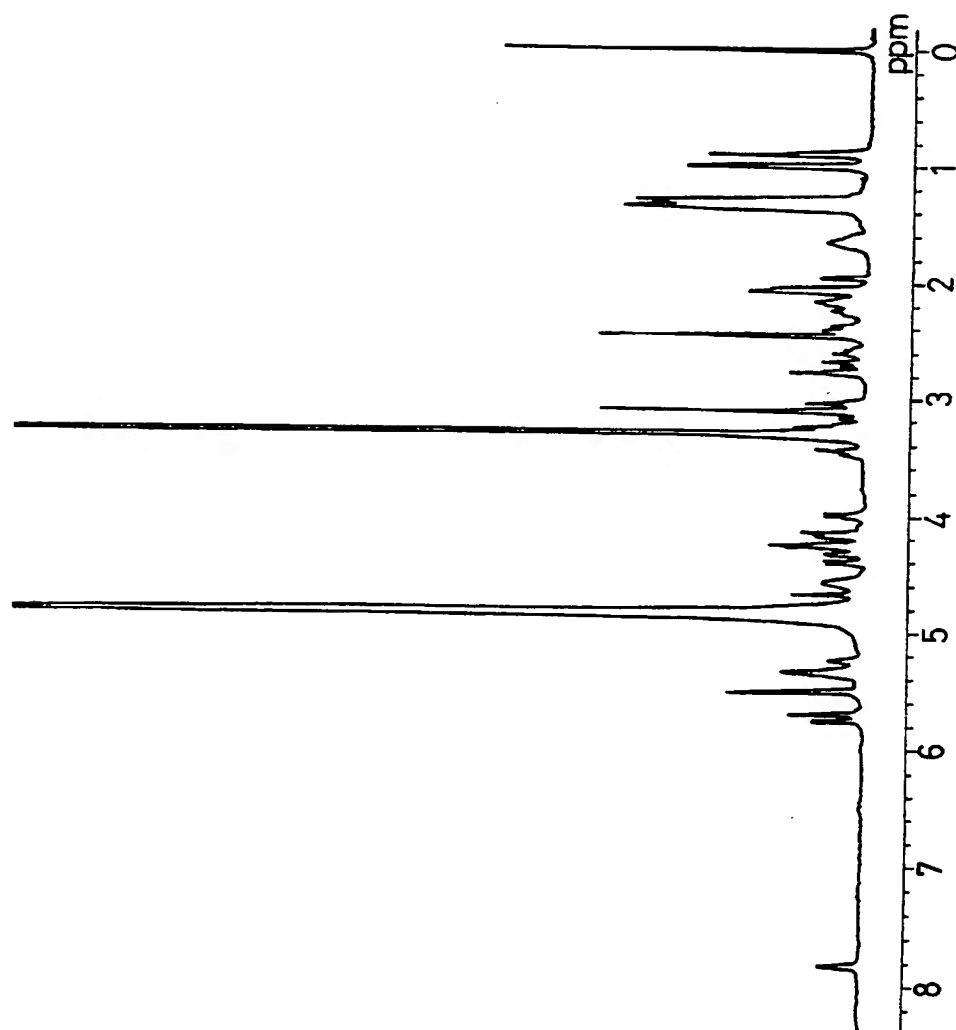


4 / 2 1

第 4 図

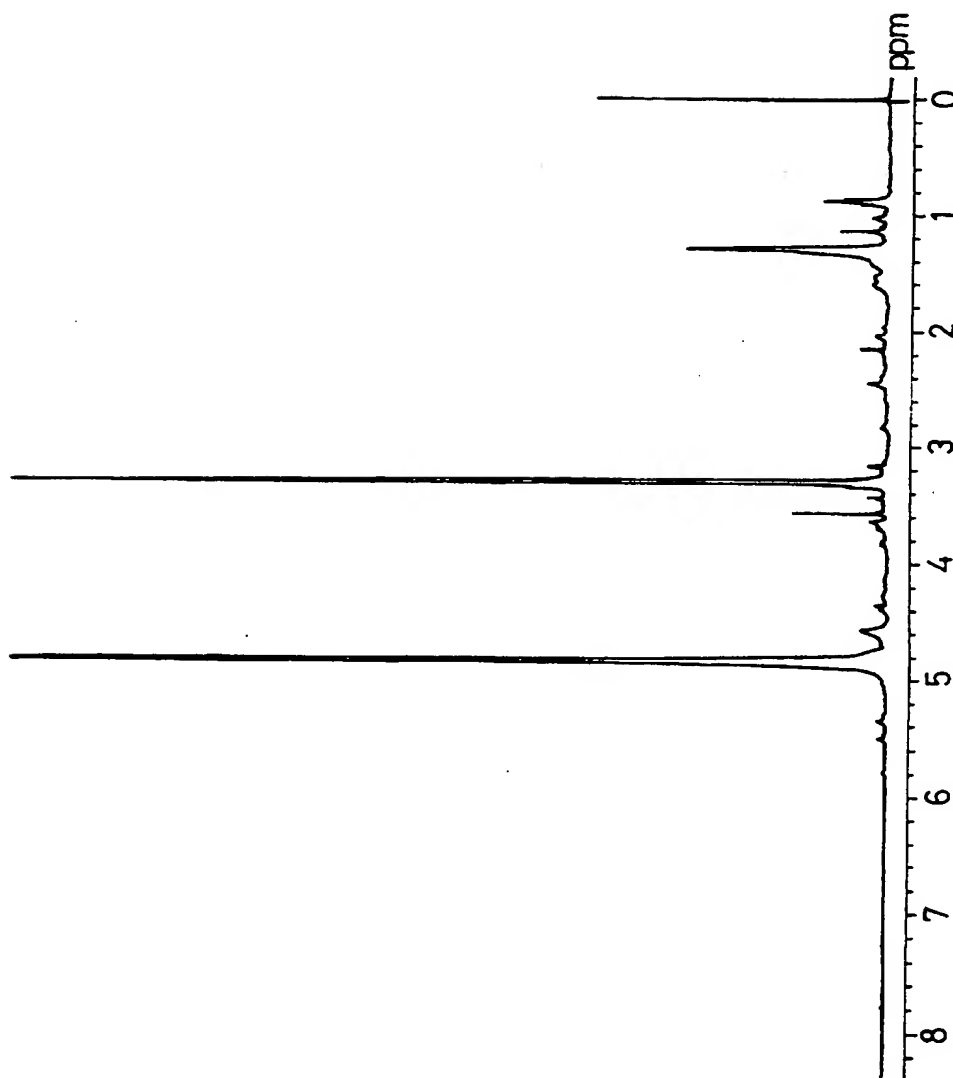


第 5 図

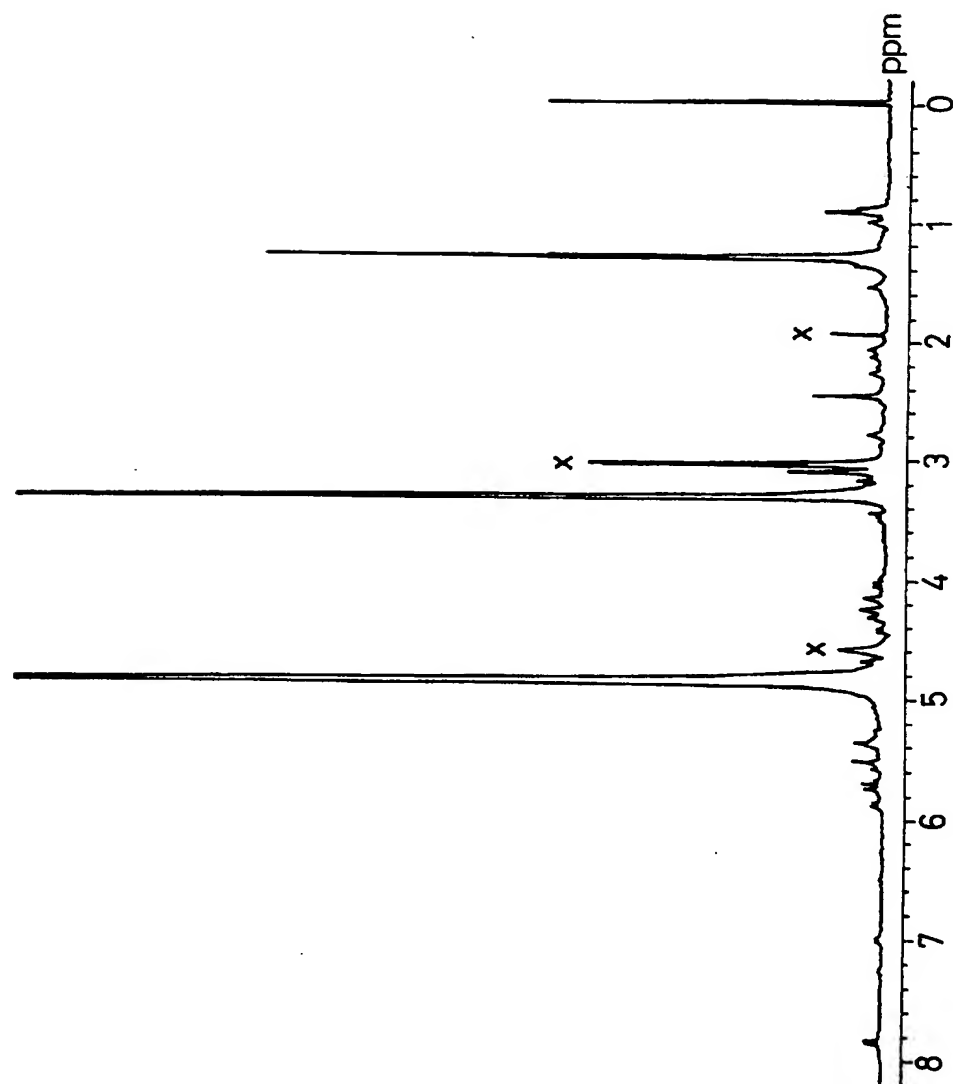


6 / 2 1

第 6 図

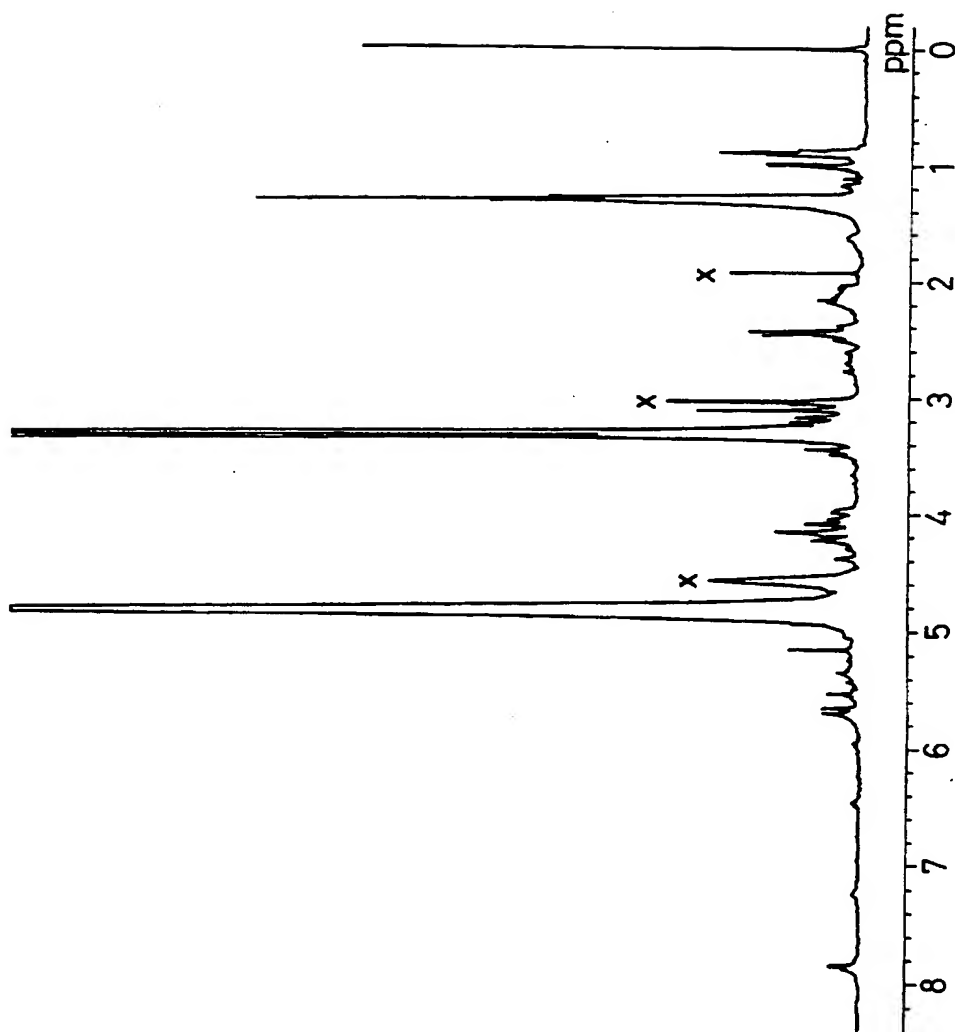


第 7 図

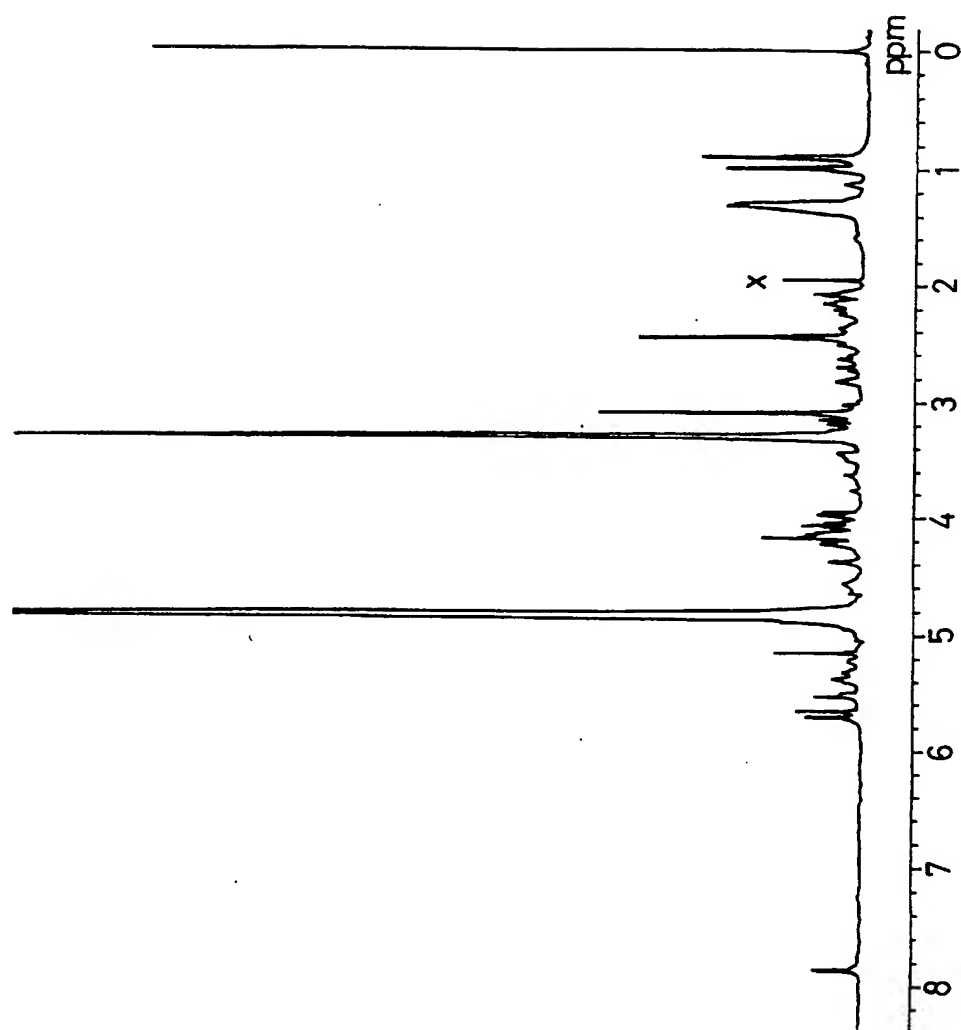


8 / 2 1

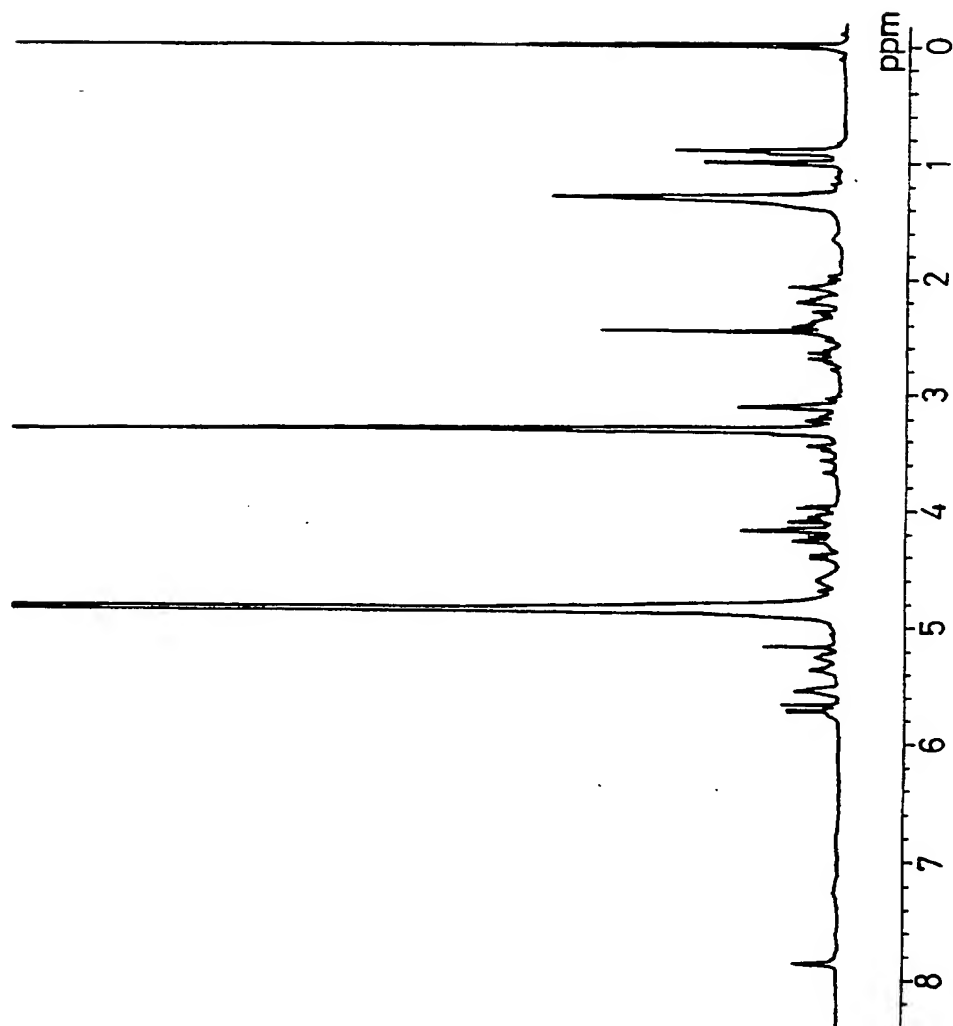
第 8 図



第 9 図

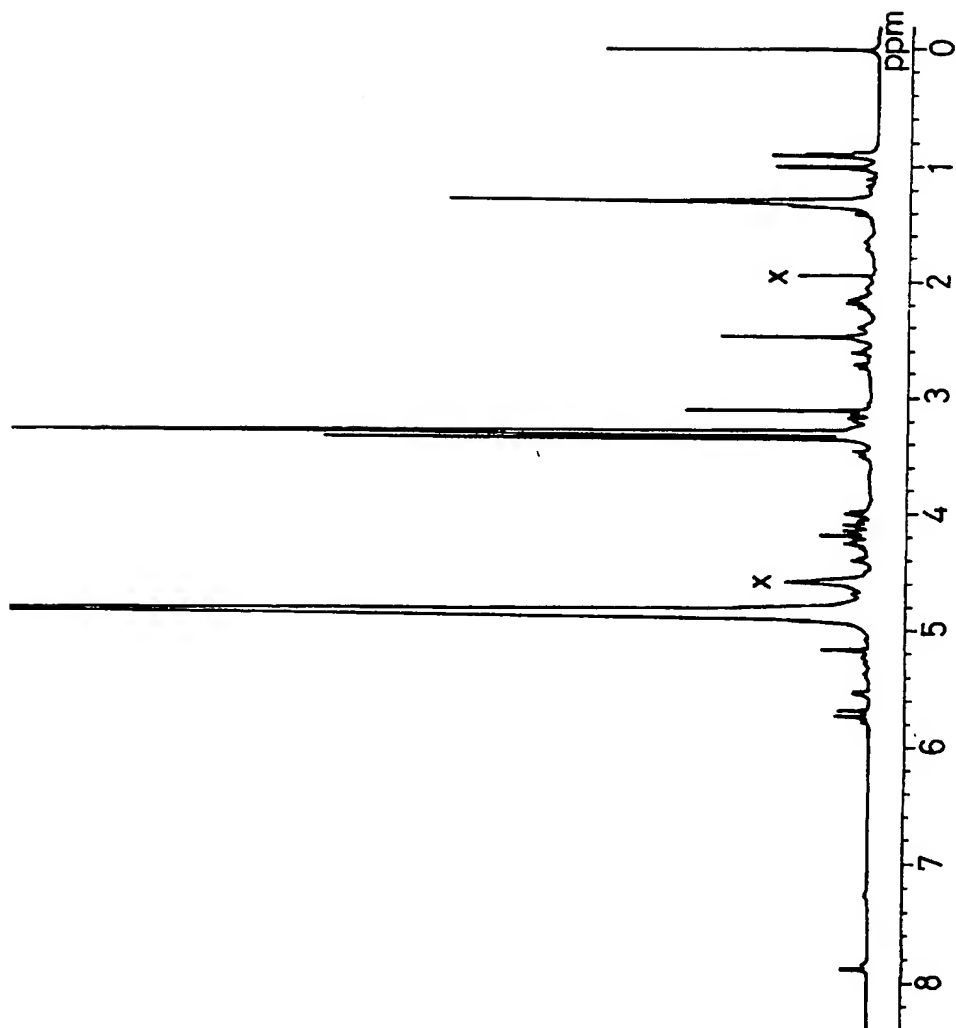


第10図

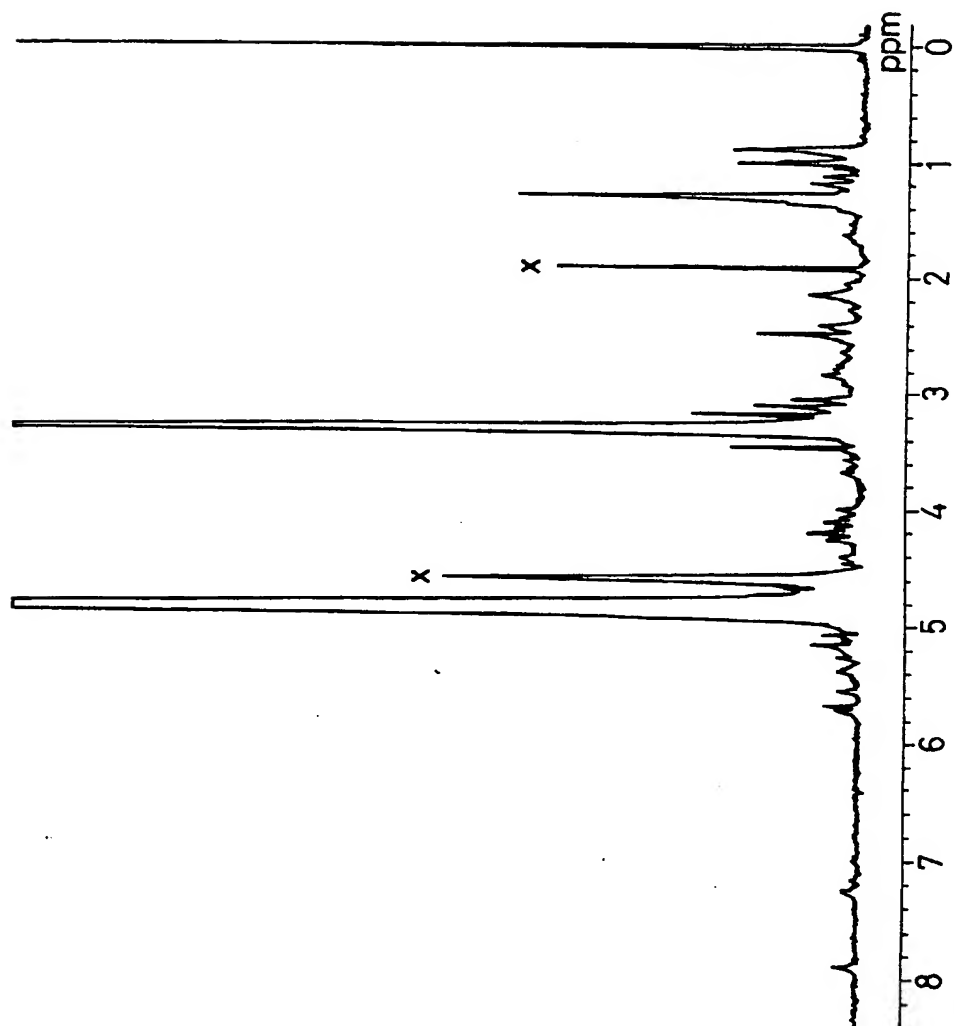


11/21

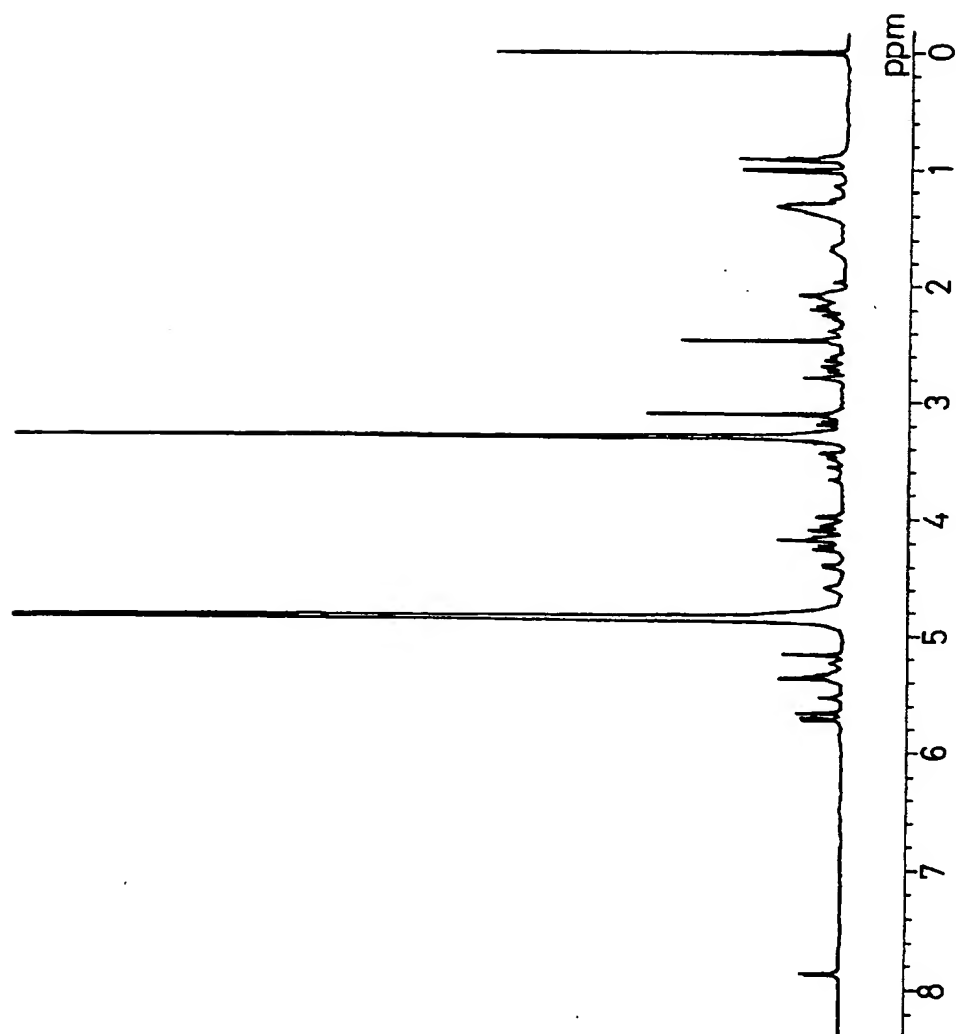
第11図



第12図

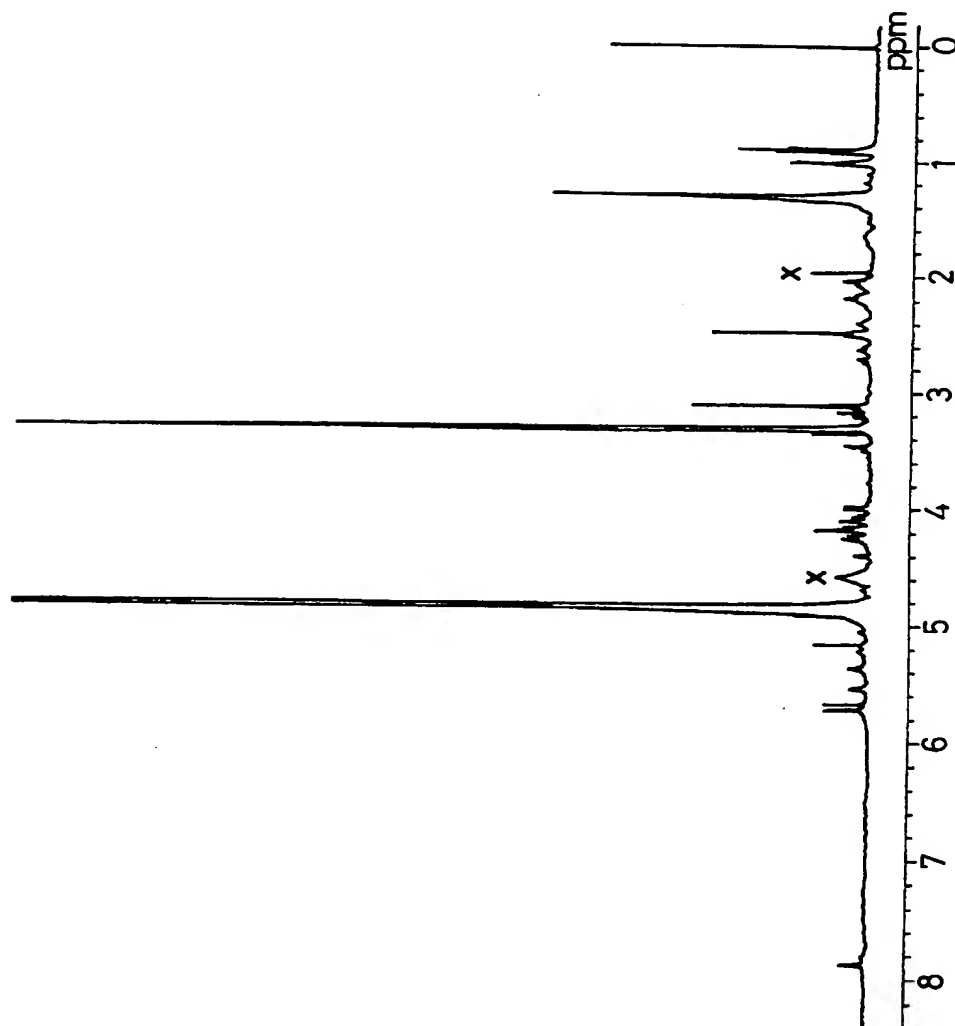


第13図

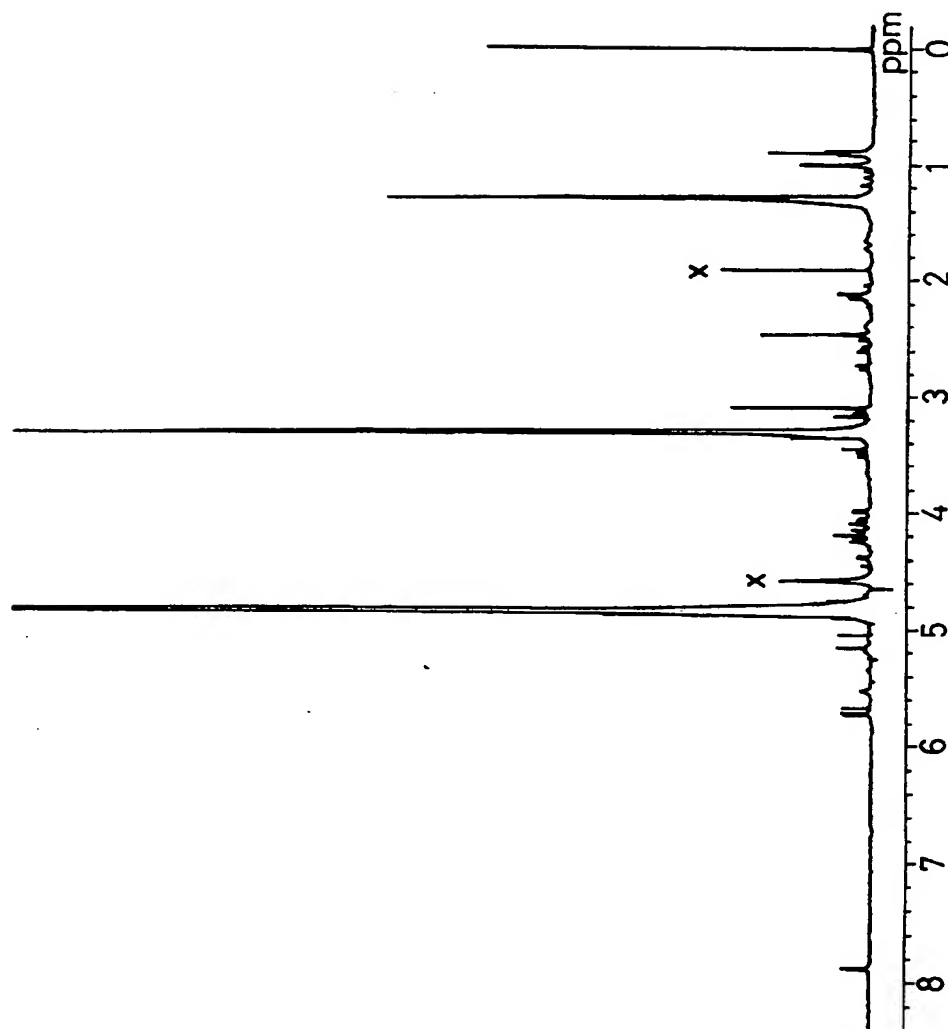


14 / 21

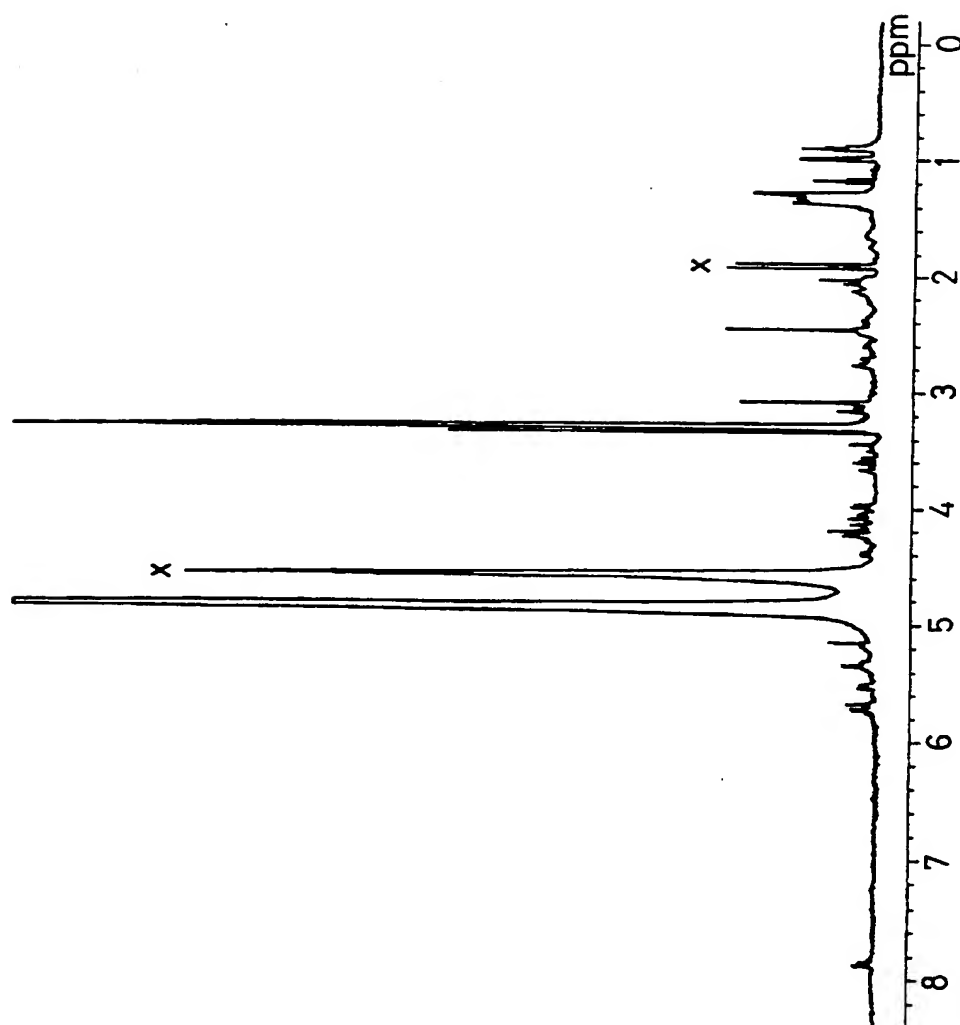
第14図



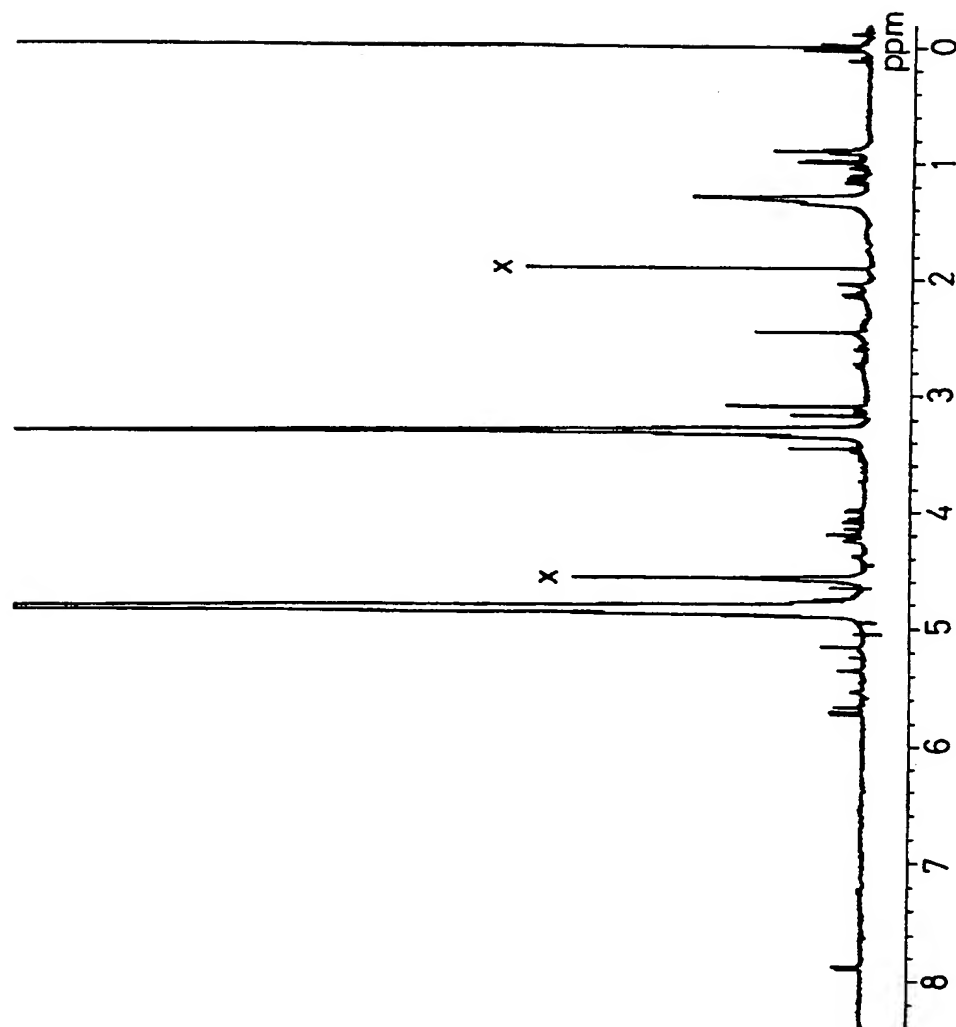
第15図



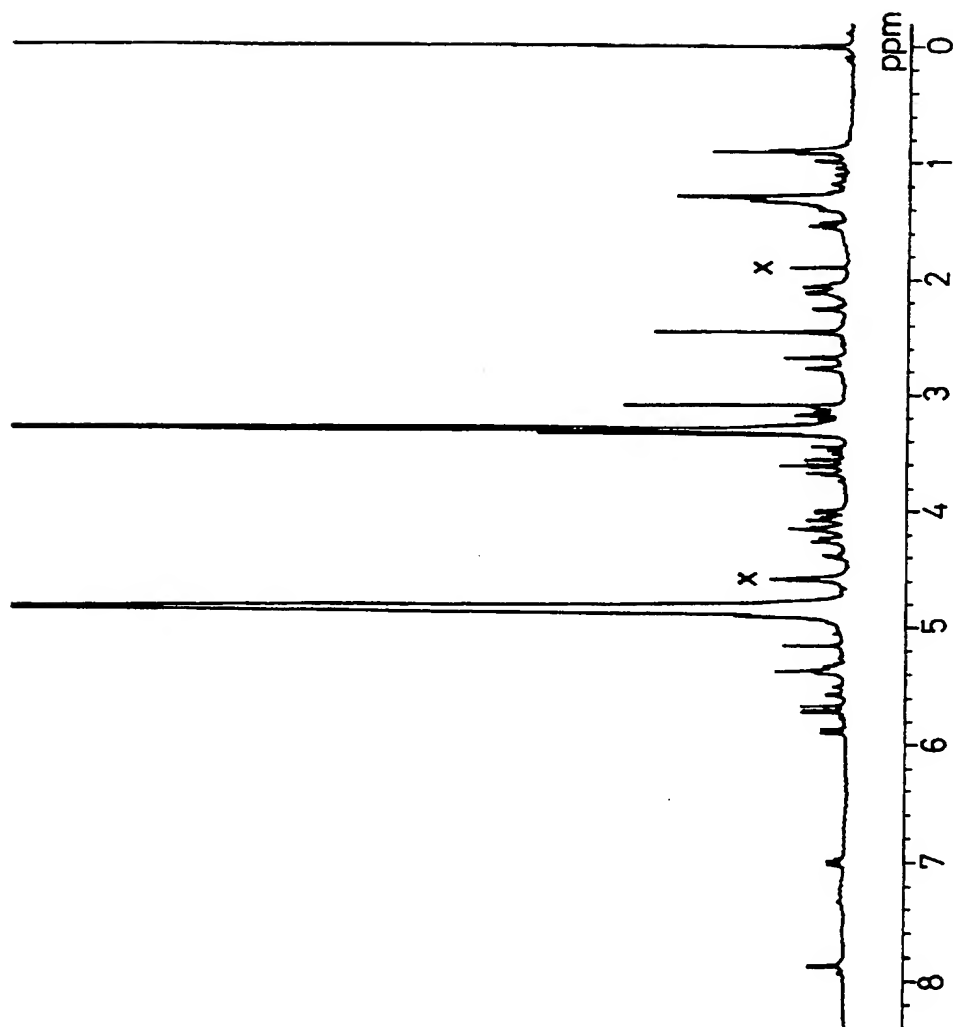
第16図



第17図

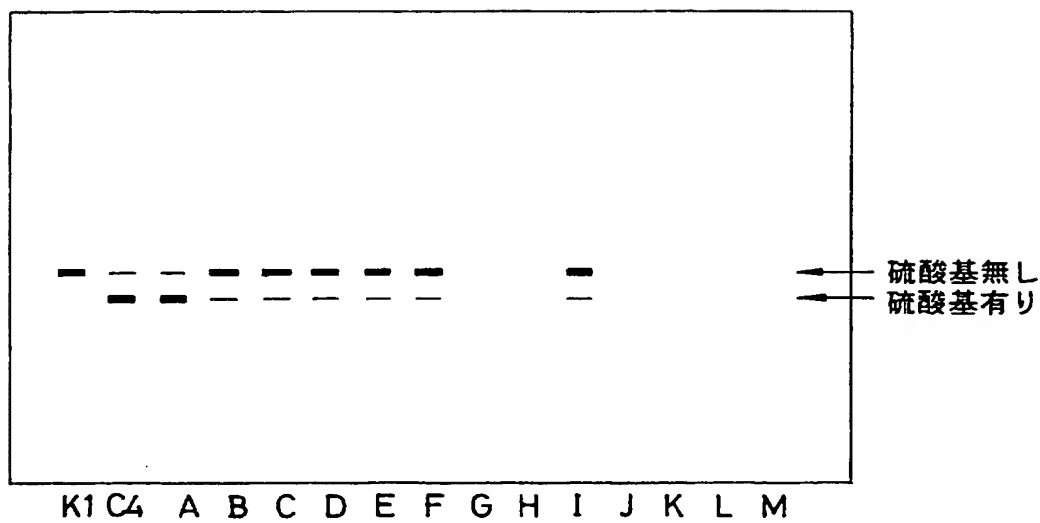


第18図



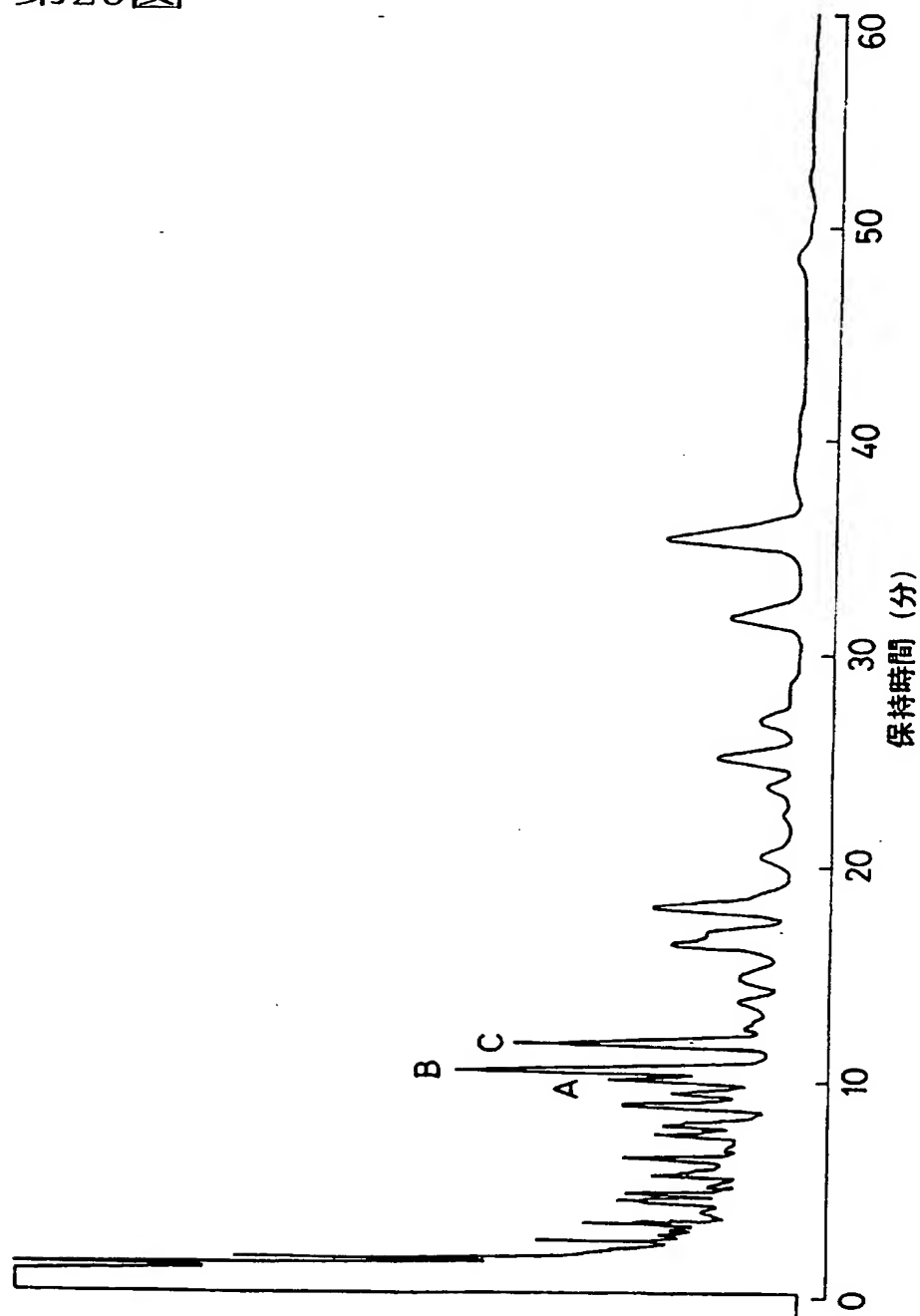
19/21

第19図



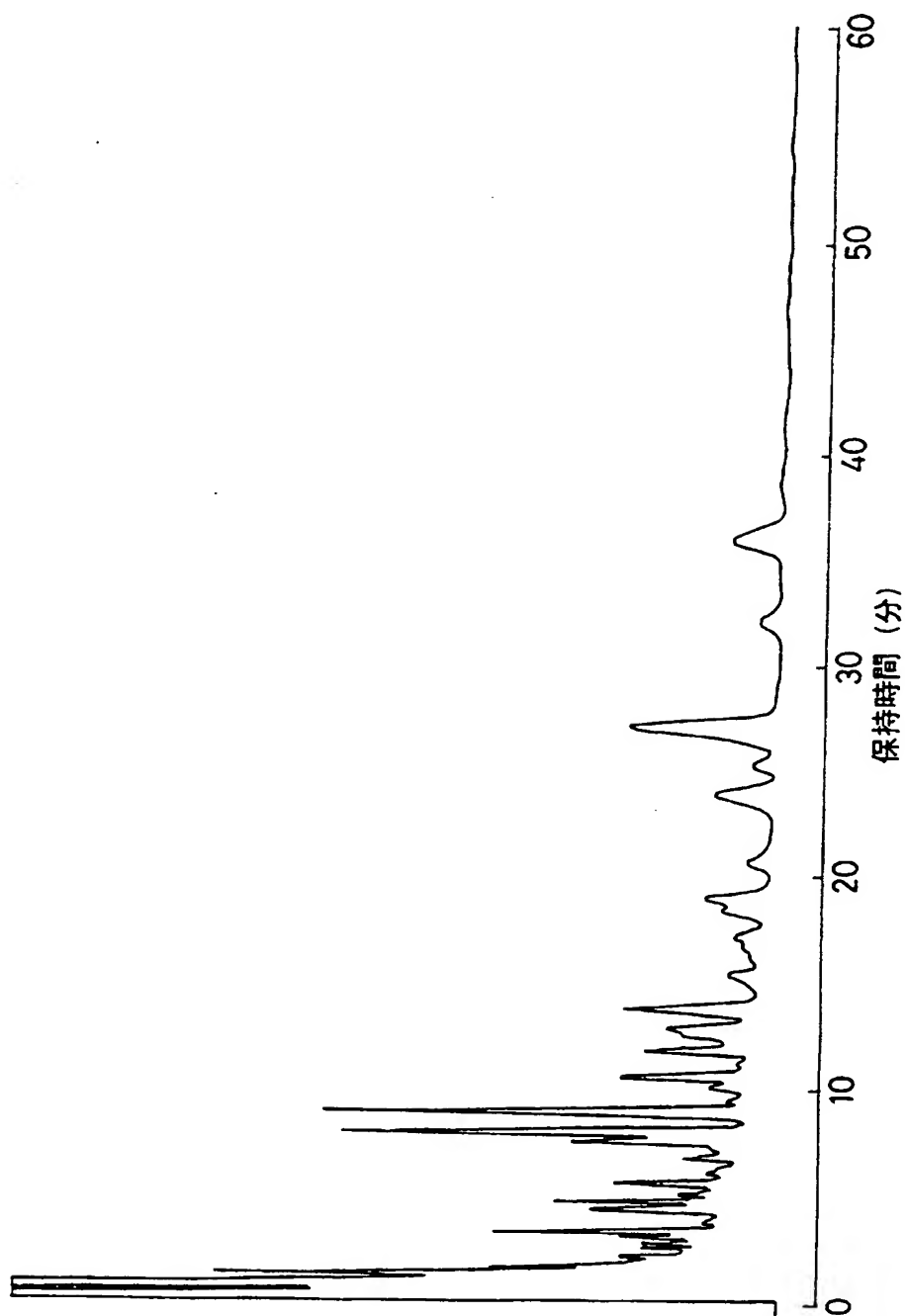
20 / 21

第20図



21 / 21

第21図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/01466

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12P17/16, C12N1/20, C07H19/06, A61K31/70, // (C12P17/16, C12R1:465), (C12N1/20, C12R1:465)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12P17/16, C12N1/20, C07H19/06, A61K31/70

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|------------------------------|
| X Y | Spencer Knapp et al. "SYNTHESIS OF THE LIPOSIDOMYCIN DIAZEPANONE" Tetrahedron Letters (1992) Vol. 33, No. 38, p. 5485-5486 | 1 - 2 3 - 5 |
| X Y | KIYOSHI ISONO et al. "LIPOSIDOMYCINS: NOVEL NUCLEOSIDE ANTIBIOTICS WHICH INHIBIT BACTERIAL PEPTIDOGLYCAN SYNTHESIS" THE JOURNAL OF ANTIBIOTIC (1985) Vol. 38, No. 11, p. 1617-1621 | 1-2, 6, 8, 10 7, 9, 11 |
| X Y | Makoto Ubukata et al. "Structure Elucidation of Liposidomycin, a Class of Complex Lipid" J. Org. Chem. (1992) Vol. 57, No. 24, p. 6392-6403 | 1-2, 10 3-5, 11 |
| X Y | Ken-ichi KIMURA et al. "Liposidomycin C Inhibits Phospho-N-acetylmuramyl-pentapeptide Transferase in Peptidoglycan Synthesis of Escherichia coli Y-10" Agric. Biol. Chem. (1989) Vol. 53, No. 7, p. 1811-1815 | 1-2, 10 11 |
| X Y | Shin Ubukata "Chemical studies on novel antibiotics (in Japanese)" Journal of the | 1-2, 10 3-5, 11 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

July 23, 1997 (23. 07. 97)

Date of mailing of the international search report

August 5, 1997 (05. 08. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/01466

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| Y | Agricultural Chemical Soc. of Japan (1988) Vol. 62, No. 11, p. 1629-1636 "Microbiological Industry (in Japanese)" K.K. Asakura Shoten (1956), p. 609-620 | 9 |

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 97/01466

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1^{*} C12P 17/16, C12N 1/20, C07H 19/06, A61K 31/70,
// (C12P 17/16, C12R 1:465), (C12N 1/20, C12R 1:465)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1^{*} C12P 17/16, C12N 1/20, C07H 19/06, A61K 31/70

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|---------------------------|
| X Y | Spencer Knapp et al. "SYNTHESIS OF THE LIPOSIDOMYCIN DIAZEPANONE" Tetrahedron Letters(1992)第33巻 第38号 p. 5485-5486 | 1-2, 3-5 |
| X Y | KIYOSHI ISONO et al. "LIPOSIDOMYCINS:NOVEL NUCLEOSIDE ANTIBIOTICS WHICH INHIBIT BACTERIAL PEPTIDOGLYCAN SYNTHESIS" THE JOURNAL OF ANTIBIOTIC(1985)第38巻 第11号 p. 1617-1621 | 1-2, 6, 8, 10 7, 9; 11 |
| X Y | Makoto Ubukata et al. "Structure Elucidation of Liposidomycin, a Class of Complex Lipid" J. Org. Chem. (1992)第57巻 第24号 p. 6392-6403 | 1-2, 10 3-5, 11 |
| X Y | Ken-ichi KIMURA et al. "Liposidomycin C Inhibits Phospho-N-acetylmuramyl-pentapeptide Transferase in Peptidoglycan Synthesis of Escherichia coli Y-10" Agric. Biol. Chem. (1989)第53巻 第7号 p. 1811-1815 | 1-2, 10 11 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

23. 07. 97

国際調査報告の発送日

05.08.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

編詞 健

4 B

9 6 3 7

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

| C (続き). 関連すると認められる文献 | | |
|----------------------|---|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| X | 生方 信,「新規抗生物質の化学的研究」日本農芸化学会誌(1988)第62巻 第11号, p. 1629-1636 | 1-2.10 |
| Y | | 3-5.11 |
| Y | | 9 |
| | 「微生物工業」株式会社朝倉書店発行(1956)p. 609-620 | |